

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE AMIODARONA Y
DESETILAMIODARONA EN PLASMA Y ERITROCITOS EN PACIENTES
CON TERAPIA CRÓNICA ORAL**

POR

ALEJANDRO QUINTERO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

DICIEMBRE, 2018

**“Determinación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona
en plasma y eritrocitos en pacientes con terapia crónica oral”**

Aprobación de Tesis

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
PRESIDENTE

Dr. Patricia González Barranco
SECRETARIA

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
VOCAL

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Determinación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona
en plasma y eritrocitos en pacientes con terapia crónica oral”**

Aprobación de Tesis

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
Directora de Tesis

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán
Co-directora de Tesis

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Comité tutorial

Dra. Patricia González Barranco
Comité tutorial

Dr. Victor Manuel Rosas García
Comité tutorial

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Alejandro Quintero González

Fecha de Graduación: Diciembre 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: Determinación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos en pacientes con terapia crónica oral

Número de páginas: 123

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El propósito de este estudio fue determinar amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos de pacientes con terapia crónica antiarrítmica y relacionar las concentraciones con la aparición de reacciones adversas por toxicidad. Las técnicas de extracción Líquido-Líquido fueron desarrolladas como pretratamiento de las matrices biológicas. Las validaciones bioanalíticas fueron realizadas siguiendo las especificaciones de la NOM-177-SSA1-2013 para la determinación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, eritrocitos y tejido adiposo subcutáneo. Las muestras fueron evaluadas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a un detector Ultravioleta Visible.

Contribuciones y Conclusiones: Los métodos de extracción Líquido-Líquido fueron desarrollados para amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo por un procedimiento efectivo y simple. Las validaciones bioanalíticas para la determinación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en muestras de pacientes con terapia crónica, representa una manera de contribuir con un marcador para prevenir reacciones adversas de toxicidad. La amiodarona en plasma resultó en mayor concentración que en eritrocitos y la desetilamiodarona no fue encontrada en diferentes concentraciones entre las mismas matrices.

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo (Asesora)

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad Autónoma de Nuevo León que a través de la Facultad de Ciencias Químicas se pudo otorgar una beca de manutención y formar parte del posgrado Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia en Padrón Nacional de Posgrados de Calidad.

A mis asesoras la Dra. Élide Marcela Agilar Bravo y la Dra. Elizabeth Orozco Beltrán por haber sido una guía académica en mi proyecto de investigación, su incondicional apoyo profesional y su capacidad de liderazgo.

Para mi comité tutorial Dr. Víctor Manuel Rosas García, Dra. Patricia González Barranco y Dra. Lucia Guadalupe Cantú Cárdenas, por toda su aportación y contribución a la mejoría y desarrollo del proyecto de tesis.

A la Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño, por la confianza otorgada en el laboratorio de Biofarmacia y su apoyo profesional, a la Dra. Minerva Villanueva Rodríguez y al Dr. Jorge Luis Guzmán Mar en el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental. Al Dr. Arturo Muñiz García por la colaboración en el IMSS. A la Dra. Diana Patricia Portales Pérez y MC Mariela Vega Cárdenas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por la donación del tejido adiposo subcutáneo.

DEDICATORIA

Este logro está dedicado a mi familia: a mis padres que han creído en mi, por proporcionarme educación y valores, Cristina y Jesús por su apoyo incondicional a mi formación académica, han sido mi ejemplo de perseverancia y constancia, me han alentado a seguir, Eduardo, Ricardo y mis 2 sobrinos Damián y Sara que alegran mi vida, todos contribuyen a hacer de mi, un ser de bien.

A mis amigos en la UANL David Alvarado mi hermano no sanguíneo, Jorge Zacatecas amigo de generación, Ismael Rodríguez, Rodolfo González, Jorge Hernández, Cynthia González, Karina Rodríguez y Karla Santamaría y en la UASLP Alicia Acosta, Laura Guzmán y Miriam Valladares por compartir ese gusto de estudiar y convertirlo en unos de los mejores momentos de nuestra vida.

INDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Uso Racional de los Medicamentos	1
1.2	Monitorización Terapéutica de Medicamentos	1
1.3	Esperanza de vida en el mundo	3
1.4	Enfermedades del corazón	3
1.4.1	Arritmias	4
1.5	Amiodarona	7
1.5.1	Farmacodinamia	9
1.5.2	Farmacocinética	9
1.5.3	Efectos adversos	13
1.6	Validación de métodos bioanalíticos	15
1.6.1	Selectividad	16
1.6.2	Límite Inferior de Cuantificación	16
1.6.3	Curva de Calibración	16
1.6.4	Precisión	16
1.6.5	Exactitud	17
1.6.6	Estabilidad de la muestra	17
2.	ANTECEDENTES.....	18
3.	JUSTIFICACIÓN.....	31

4.	HIPÓTESIS.....	33
5.	OBJETIVO GENERAL.....	33
5.1	Objetivos específicos:	33
6.	MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS	35
6.1	Material de uso hospitalario	35
6.2	Reactivos y material de uso en método analítico	35
6.3	Equipos	36
7.	METODOLOGÍA.....	37
7.1	Ubicación de los equipos	37
7.1.1	Desarrollo de condiciones cromatográficas	37
7.1.2	Obtención de matrices biológicas libres de fármaco	38
7.1.3	Extracción simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	39
7.2	Validación de método bioanalítico	41
7.2.1	Validación de los métodos bioanalíticos para cuantificación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	41
7.2.2	Procedimientos en Unidad Clínica	49
7.3	Análisis estadístico	52
7.4	Disposición de residuos	52
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
8.1	Desarrollo de condiciones cromatográficas	54

8.2 Extracción simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y lisado eritrocitario	58
8.3 Validación del método analítico para la cuantificación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	66
8.3.1 Selectividad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	66
8.3.2 Límite Inferior de Cuantificación de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	69
8.3.3 Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	71
8.3.4 Precisión de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	80
8.3.5 Exactitud del método bioanalítico de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	89
8.3.6 Estabilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	92
8.3 Procedimientos en unidad clínica	101
9. CONCLUSIONES	114
10. BIBLIOGRAFÍA	116

INDICE DE ABREVIATURAS

ABC_T	Área bajo la curva total
AMD	Amiodarona
ALT	Alanina Aminotransferasa
AST	Aspartato Aminotransferasa
BD	Biodisponibilidad
DEA	Desetilamiodarona
C_{máx}	Concentración plasmática máxima
C_{máxee}	Concentración plasmática máxima del estado estacionario
Cl_r	<i>Clearence renal</i>
DE	Desviación estándar
FA	Fibrilación auricular
FLA	Flúter auricular
LIC	Límite Inferior de Cuantificación
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IMC	Índice de Masa Corporal
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>

K₂EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetracético dipotásico
Kg m⁻²	Kilogramo sobre metro cuadrado
MC	Muestra Control
MCA	Muestra Control Alta
MCB	Muestra Control Baja
MCM	Muestra Control Media
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minutos
lpm	Latidos por minuto
LogD	Coeficiente de distribución
LogP	Coeficiente de partición
LogS	Coeficiente de solubilidad
t_{1/2}	Tiempo de vida media
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
TDM	<i>Therapeutic Drug Monitoring</i>
t_R	Tiempo de retención
TS	Taquicardia Supraventricular
TSP	Taquicardia Supraventricular Paroxística
pKa	Potencial de disociación ácida
pH	Potencial de Hidrógeno

RPBI	Residuos Peligrosos Biológico- Infecciosos
r	Coeficiente de correlación
r²	Coeficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
rT3	Triyodotironina reversa
s	Segundos
UV-Vis	Ultravioleta Visible
WHO	<i>World Health Organization</i>
°	Grados Celsius
%	Porcentaje
CV%	Coeficiente de variación
µg	Microgramo
µL	Microlitro

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Perfil farmacocinético de la amiodarona.....	11
Tabla 2 Características fisicoquímicas de AMD y DEA	12
Tabla 3 Incidencia de reacciones extracardíacas de amiodarona.....	13
Tabla 4 Concentraciones de soluciones metanólicas 20x de la Curva de Calibración de plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.....	42
Tabla 5 Concentraciones de soluciones de la Curva de Calibración y Límites Inferiores de Cuantificación en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.....	43
Tabla 6 Criterios de inclusión y exclusión	50
Tabla 7 Ecuaciones de la Curva de Calibración y Coeficientes de determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	72
Tabla 8 CV% de los puntos de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.....	73
Tabla 9 CV% del ensayo de Repetibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario, tejido adiposo subcutáneo.....	82
Tabla 10 CV% del ensayo de Reproducibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.....	86

Tabla 11 Promedio de % de desviación de la concentración obtenida de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de Repetibilidad	90
Tabla 12 Promedio de porcentaje de desviación de la concentración obtenida de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de Reproducibilidad.....	91
Tabla 13 Porcentaje de recuperación del ensayo de estabilidad a corto y largo plazo de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo	93
Tabla 14 Porcentaje de recuperación del ensayo de estabilidad en el automuestreador y ciclos de congelación-descongelación de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.....	94
Tabla 15 Datos clínicos y demográficos de los pacientes	102
Tabla 16 Concentración media y rango de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos en pacientes en estado estacionario (n=5).....	103
Tabla 17 Dosis de amiodarona (mg) e IMC (kg m^{-2}) de los pacientes reclutados en el estudio	105
Tabla 18 Frecuencia de reacciones adversas extracardíacas	109

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Benzofurano.....	25
Figura 2 Espectro de AMD 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol	54
Figura 3 Espectro de DEA 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol	55
Figura 4 Cromatograma correspondiente a una solución de DEA (t_R : 5.6 min) a una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol.....	56
Figura 5 Cromatograma correspondiente a una solución de AMD (t_R : 9.2 min) a una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol.....	56
Figura 6 Cromatograma correspondiente a una mezcla de DEA (t_R : 5.6 min) y AMD (t_R : 9.2 min) a una concentración de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol	57
Figura 7 Cromatograma del extracto de DEA y AMD 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en plasma precipitando proteínas con acetonitrilo	60
Figura 8 Cromatograma del extracto de DEA y AMD 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en lisado eritrocitario precipitando proteínas con acetonitrilo.....	60
Figura 9 Cromatograma del extracto de DEA y AMD 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ en tejido adiposo subcutáneo precipitando proteínas con acetonitrilo.....	61
Figura 10 Cromatograma del extracto de plasma libre de fármaco.....	66
Figura 11 Cromatograma del extracto del lisado eritrocitario libre de fármaco	67
Figura 12 Cromatograma del extracto de tejido adiposo subcutáneo libre de fármaco.....	67
Figura 13 Curva de Calibración de AMD y DEA en plasma	75

Figura 14 Curva de Calibración de AMD y DEA en lisado eritrocitario.....	76
Figura 15 Curva de Calibración de AMD y DEA en tejido adiposo subcutáneo	77
Figura 16 Representación de los porcentajes de recuperación de cinco réplicas de cada muestra control para amiodarona y desetilamiodarona. LIC de la Curva de Calibración (lado izquierdo), MCB, MCM y MCA (lado derecho) en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo. Las líneas discontinuas muestran el mínimo y el máximo porcentaje de Recuperación en el ensayo de repetibilidad indicado por la NOM-177- SSA1-2013 siendo 80-120 % para el LIC y 85-115 % para MCB MCM y MCA.....	83
Figura 17 Representación de los porcentajes de recuperación de cinco réplicas de cada muestra control para amiodarona y desetilamiodarona. LIC de la Curva de Calibración (lado izquierdo), MCB, MCM y MCA (lado derecho) en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo. Las líneas discontinua muestran el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación en el ensayo de Reproducibilidad indicado por la NOM-177- SSA1-2013 siendo 80-120 % para el LIC y 85-115 % para MCB MCM y MCA.....	87
Figura 18 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177- SSA1-2013	95

Figura 19 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en lisado eritrocitario en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177-SSA1-2013.....	98
Figura 20 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177-SSA1-2013	99
Figura 21 Concentraciones de amiodarona en plasma y eritrocitos y desetilamiodarona plasmática y eritrocitaria de pacientes en estado estacionario (n=5).....	103

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Uso Racional de los Medicamentos

El Uso Racional de los Medicamentos es una estrategia sanitaria a nivel mundial dirigida por la WHO (*World Health Organization*) que permite que los pacientes reciban la mejor calidad en su tratamiento farmacológico adecuado a sus necesidades clínicas, la cual consiste en recibir las dosis correctas en sus requisitos individuales por la óptima vía de administración y adecuada forma farmacéutica, durante el tiempo correcto y al menor costo posible.¹ Esta estrategia permite fortalecer la actividad clínica por los profesionales de la salud donde el monitoreo terapéutico de los medicamentos y su relación con la presencia de los efectos adversos representa una oportunidad para contribuir en el cuidado de los pacientes y en la mejor efectividad de los tratamientos farmacológicos.

1.2 Monitorización Terapéutica de Medicamentos

La TDM (*Therapeutic Drug Monitoring*), en sangre o tejidos es una actividad de la farmacia clínica que pretende establecer relaciones de concentración-respuesta principalmente de los medicamentos con margen estrecho de

seguridad, utilizando parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos para individualizar y optimizar los resultados terapéuticos de pacientes específicos.² Otros de los objetivos de la monitorización de fármacos es minimizar efectos adversos e interacciones asociadas, comprobar cumplimiento terapéutico y determinar las condiciones de variabilidad de la cinética del fármaco en diferentes estados fisiopatológicos de los pacientes.³

Algunas de las dificultades en la cuantificación de fármacos han sido por una parte: la necesidad de técnicas sensibles de alta resolución como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), que permitan detectar las bajas concentraciones que alcanza el medicamento y sus metabolitos en los fluidos biológicos y por otra parte la falta de estas técnicas a nivel hospitalario.⁴ Así mismo existen ciertas características propias de los medicamentos que hacen justificable realizar monitorización terapéutica como son: estrecho índice terapéutico, dificultad para valorar clínicamente su eficacia o toxicidad, gran variabilidad en su comportamiento cinético y para los que no exista una definida relación dosis-respuesta. Algunos de los fármacos que cumplen estos criterios que son ampliamente usados en clínica son: carbamazepina, fenitoína, ácido valproico, disopiramida, lidocaína, quinidina, digoxina y amiodarona, entre otros.²

1.3 Esperanza de vida en el mundo

La esperanza de vida es el marcador indicativo para evaluar la calidad de vida de la población, se define como la cantidad de años que se vive en un periodo determinado, referida a personas que tienen una muerte no violenta. En el 2016 se reportó a Suiza como el país con el primer lugar en calidad de vida con un valor de 80.7 años para hombres y 86.6 años para mujeres, mientras que México quedó posicionado en el lugar 30 con una esperanza de 71.7 años para hombres y 77.4 para mujeres según el CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) de Estados Unidos de América.⁵ Las enfermedades del corazón influyen entre la primer y segunda causa de muerte en el mundo por lo que siguen siendo un tema de interés en la salud.

1.4 Enfermedades del corazón

Las enfermedades cardiovasculares ocasionan un mayor índice de mortalidad que las enfermedades crónicas incluido el cáncer. Las estadísticas del 2015 de la WHO reportaron 56 millones de defunciones, de las cuales la primera causa fue enfermedades cardiovasculares con un total de 15 millones, una cifra que se proyecta aumentará a más de 23.6 millones para el año 2030.⁶ En los últimos 20 años la mortalidad por estas enfermedades disminuyó notablemente como respuesta a los cuidados profilácticos, a pesar de esto las enfermedades coronarias e insuficiencias cardíacas son responsables de un gran número de

muerres por año en todo el mundo, donde aproximadamente el 25% se deben a paro cardíaco súbito.⁷

En México no existen datos aproximados en relación entre las muertes y las patologías asociadas al corazón sin embargo, se conoce que en las mujeres entre 35 y 44 años de edad, estas enfermedades son la tercer causa de muerte; en los hombres y mujeres entre 45 y 64 años es la segunda y tercer causa de muerte respectivamente, mientras que para ambos sexos mayores de 65 años se convierte en la primer causa.⁸ Las arritmias son algunas de las enfermedades del corazón con alta frecuencia en la población después de los 35 años que predisponen a los pacientes en riesgos cardiovasculares.

1.4.1 Arritmias

Se define arritmia como la modificación de la frecuencia cardíaca por la alteración de la conducción del impulso nervioso que puede ser superior o inferior a la de los latidos normales que son 60-100 lpm (latidos por minuto); denominándose bradicardia cuando este valor es inferior a 60 lpm y taquicardia cuando el valor es superior a 100 lpm. Las taquiarritmias pueden ser supraventriculares o ventriculares según la localización. La existencia de una arritmia puede tener diferentes consecuencias fisiopatológicas, dependiendo del tipo de arritmia y de la presencia de patologías cardíacas.

Las arritmias cardíacas son una de las causas más frecuentes de hospitalización en Estados Unidos de América y Europa con aproximadamente 7.5 millones de casos anuales, se calcula que la incidencia será 2.5 veces mayor para el 2050. La gravedad de esta patología aumenta significativamente el riesgo de embolia cerebral, falla cardíaca y eventualmente la muerte.¹¹

1.4.1.1 Taquiarritmias supraventricular

Taquicardia sinusal (TS): Esta taquicardia es común y puede presentarse asintomática, es usualmente un resultado de ansiedad, fiebre, tirotoxicosis, hipovolemia aguda, anemia o alguna otra enfermedad aguda. Normalmente la taquicardia sinusal resulta del incremento del tono simpático o decremento del tono parasimpático, en general la incidencia y prevalencia es difícil de determinar debido a que esta condición es generalmente transitoria.

Fibrilación atrial (FA): Es el trastorno clínico relacionado al ritmo cardíaco más prevalente en la población de pacientes de edad avanzada, afecta alrededor de 2.3 millones de americanos, aproximadamente el 6% de la población de edad mayor a 65 años y 12% de la mayor a 85 años.

La FA parece ser más frecuente en hombres que en mujeres sin embargo, en las poblaciones de más de 75 años las cifras tienden a igualarse. Diversos factores pueden contribuir al incremento de fibrilación atrial, tales como la edad y

las condiciones de comorbilidad, entre ellas, la obesidad, hipertensión, diabetes, tirotoxicosis y desórdenes de válvulas mitrales.

Flutter atrial (FLA): Este tipo de arritmia se caracteriza por un valor de lpm mayor a 300, su prevalencia es menor al 1%, es una las causas de mayor frecuencia de ingresos de pacientes a hospitales a través de los servicios de urgencias y ha sido asociada con la fibrilación auricular posquirúrgica que requiere el uso de anticoagulantes para reducir el riesgo de mortalidad por eventos tromboembólicos.

Taquicardia supraventricular paroxística (TSP): Se caracteriza por un ritmo rápido y regular debido a que en alguna estructura por arriba del Haz de His se encuentra afectada, suelen aparecer sin cardiopatías estructurales y pueden considerarse benignas aunque producen cierto grado de incapacidad. Esta arritmia engloba el diagnóstico de taquicardia atrial, taquicardia atrioventricular nodal y taquicardia atrioventricular recíproca. Se estima que existen 6 casos por cada 1 000 sujetos con más de 65 años de edad en población de edad avanzada ya que la incidencia se incrementa en forma que aumenta la edad. ¹²

1.4.1.2 Tratamiento

Las arritmias pueden controlarse con tratamiento farmacológico y no farmacológico como marcapasos, cardioversión, ablación por catéter y cirugía. El

objetivo del tratamiento en las arritmias es disminuir la actividad del marcapaso ectópico y modificar la conducción o periodo refractario en los circuitos de reentrada.

En el tratamiento farmacológico se encuentran el grupo de los antiarrítmicos y son clasificados según la escala de Vaughan Williams:

Clase 1: Bloqueadores de canales de sodio

Clase 2: Beta-bloqueadores

Clase 3: Bloqueadores de los canales de potasio

Clase 4: Bloqueadores de los canales de calcio

Existen diferentes tratamientos para las arritmias cardíacas como esmolol, propanolol, sotalol, flecainamida, procainamida entre otros⁷ sin embargo, la amiodarona es el fármaco de mayor efectividad disponible actualmente como alternativa farmacológica en taquicardia ventricular y atrial, además de tener un aparente efecto cardioprotector.^{14,15}

1.5 Amiodarona

La amiodarona fue desarrollada por el Laboratorio Belga Labaz, como un derivado del benzofurano en el año 1960. Los antiarrítmicos utilizados en esa

época eran quinidina, lidocaína y metilxantina aunque la respuesta terapéutica no era tan efectiva, por otro lado el número de prescripciones habían aumentado de 4 a 12 millones para el año 1986 por lo que surgió la necesidad de incluir nuevas moléculas para tales patologías. Una de estas moléculas fue la amiodarona y tiempo después se reconoció que poseía actividad antiarrítmica en ensayos con animales; a pesar de no contar con la aprobación de las agencias reguladoras de medicamentos, comenzó a ser prescrita en los pacientes con taquicardias. Fue hasta 1985 que en Estados Unidos de América se aprobó como tratamiento para las taquicardias ventriculares y tuvo un periodo de gran aceptabilidad posicionándose como un antiarrítmico ideal debido a su alta efectividad en taquicardia ventricular refractaria, con pocos efectos adversos reportados hasta ese momento, sin efectos inotrópicos y además fue el primer agente oral en dosis única diaria.¹⁷

La amiodarona exhibe un amplio espectro de acción que incluye el bloqueo de canales de sodio y potasio que repolarizan la corriente cardíaca, por lo cual se considera uno de los antiarrítmicos de mayor efectividad. Estas acciones pueden inhibir o terminar las arritmias ventriculares influyendo en la automaticidad del corazón.⁹ Se le ha reconocido una eficacia y amplia prescripción como tratamiento de arritmias sin embargo, la amiodarona posee numerosos efectos adversos debidos a su extraordinaria farmacocinética y toxicidad que exhibe.¹⁶

1.5.1 Farmacodinamia

La amiodarona es un antiarrítmico con una predominancia Clase III, aunque también posee efectos Clase I, II y IV en la clasificación de Vaughan Williams por lo que probablemente todo eso contribuye a su efecto antiarrítmico, posee un variado patrón de efectos electrofisiológicos, por lo que se prescribe con el objetivo de controlar arritmias, fibrilaciones y como antiisquémico.¹⁸ La amiodarona disminuye la fuerza de contracción en el ventrículo izquierdo, disminuye la resistencia vascular periférica lo cual probablemente se deba a la vasodilatación periférica más que a la acción de beta-bloqueador o antagonista de los canales de Calcio, dilata las arterias y reduce la resistencia en los vasos a nivel coronario, la amiodarona también puede ejercer un efecto antiarrítmico como consecuencia del incremento del flujo coronario.¹⁵ El efecto como antiisquémico puede deberse a que la amiodarona incrementa el flujo sanguíneo en las arterias coronarias ejerciendo un efecto cardioprotector.¹⁸ La amiodarona ha sido considerada como el fármaco “estándar de oro” debido a todos los efectos electrofisiológicos en el control de las arritmias.¹⁹

1.5.2 Farmacocinética

La farmacocinética de la amiodarona es compleja y hasta ahora no ha sido completamente descrita; la relación de la dosis, concentración plasmática y eficacia aún siguen sin describirse en su totalidad. Este fármaco muestra una mayor acumulación en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. Una de las

condiciones fisiopatológicas de los pacientes que afecta su farmacocinética es la obesidad, ya que al variar la absorción, distribución, metabolismo y excreción en estos pacientes, afecta la eficacia del fármaco al igual que influye en los efectos adversos.²⁰

La amiodarona exhibe una absorción lenta y un amplio metabolismo de primer paso con circulación enterohepática tras una administración unidosis oral, lo que refleja una BD (biodisponibilidad) variable entre 20 y 80%. Su principal metabolito es la DEA (mono-N-desetilamiodarona), con efecto electrofisiológico similar al fármaco original.³ La $C_{\text{máx}}$ (concentración máxima) se alcanza entre las 4-6 horas después de una administración oral, puede seguir varias vías metabólicas y finalmente una de reacción de tipo N-desalquilación, eliminándose por vía biliar, el Cl_r (aclaramiento renal) no es significativo. La amiodarona y la desetilamiodarona son compuestos altamente lipofílicos, lo que explica su amplio V_d (volumen de distribución) retardando el efecto terapéutico, por lo que un modelo farmacocinético de más de un compartimento es el que mejor explicaría su cinética.¹⁵ Después de la fase de distribución, los niveles de amiodarona y desetilamiodarona son encontrados en diversos tejidos, como el adiposo subcutáneo, corazón, pulmón, hígado y nódulos linfáticos. En terapia crónica oral se sabe que el $t_{1/2}$ (tiempo de vida media), es de hasta 60 días y se ha sugerido que no existe una correlación entre el efecto antiarrítmico y la concentración en plasma. Las concentraciones plasmáticas de amiodarona entre $1.0\text{-}1.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ están asociadas con el control de las arritmias ventriculares, mientras que mayores de $2.5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ no proporcionan un efecto antiarrítmico adicional y se

han asociado con toxicidad neuronal. Una relación entre la concentración de desetilamiodarona y amiodarona mayor a 1.4, se ha relacionado con un incremento del riesgo de toxicidad.³

En la tabla 1 se describen los principales parámetros farmacocinéticos de la amiodarona

Tabla 1 Perfil farmacocinético de la amiodarona

Parámetro farmacocinético	Resultado
Tiempo de absorción	2-12 h
Grado de absorción	Bajo y lenta
Biodisponibilidad	Variable 20-86 %
Tiempo de concentración máxima	4-6 h
Unión a proteínas	96 %
Volumen de distribución	
• agudo (dosis única)	• 1.3-65.8 L kg ⁻¹
• estado estacionario	• 5.0 L kg ⁻¹
Eliminación	Hepática
Vida media	
• aguda	• 3-21 h
• crónica	• 52.6 días
Aclaramiento total	0.10-0.77 L min ⁻¹
Metabolitos	Mono-N-desetilamiodarona Bi-N-desetilamiodarona Metabolitos desyodados
Concentración máxima en el estado estacionario	2.5 µg mL ⁻¹
Concentración terapéutica	1.0-2.5 µg mL ⁻¹

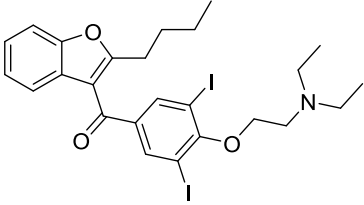
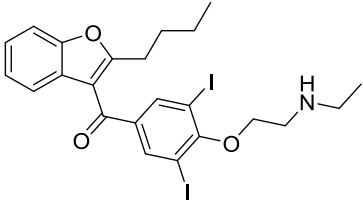
15

El principal órgano involucrado en la conversión de la amiodarona en sus metabolitos es el hígado, sin embargo, otros tejidos también contribuyen al metabolismo de la misma y varias isoformas de la enzima CYP han sido descritas en el metabolismo de amiodarona en humanos.²¹

La amiodarona es metabolizada a desetilamiodarona por el citocromo P450, principalmente por la isoforma *CYP3A4* que metaboliza el 40% del fármaco en las primeras 24 horas de la exposición.²² Otras isoformas de la enzima CYP también han sido descritas en el metabolismo de la amiodarona, *CYP1A1*, *2C8*, *2D6* además del *3A4* exhibiendo una potencial conversión a desetilamiodarona y didesetilamiodarona.²¹

En la tabla 2 se describen las características fisicoquímicas de la amiodarona y la desetilamiodarona como principal metabolito.

Tabla 2 Características fisicoquímicas de AMD y DEA

Parámetro	amiodarona	desetilamiodarona
Masa molecular	645.32 g mol ⁻¹	617.26 g mol ⁻¹
Fórmula		
Composición	C ₂₅ H ₂₉ I ₂ NO ₃ Carbono 46.53 % Hidrógeno 4.53 % Iodo 39.33 % Nitrógeno 2.17 % Oxígeno 7.44 %	C ₂₃ H ₂₅ I ₂ NO ₃ Carbono 44.75 % Hidrógeno 4.08 % Iodo 41.12 % Nitrógeno 2.27 % Oxígeno 7.78 %
Anillos aromáticos	3	3
Donador de Hidrógenos	0	1
pKa	8.47	9.4
Log P	7.64	6.9
Log D pH 7.4	6.53	4.92
Log S pH 7.4	-6.38	-5.13

1.5.3 Efectos adversos

Diversos efectos adversos son evidentes en pacientes que están en tratamiento crónico con amiodarona, desde los clínicamente no significativos, como los depósitos corneales, hasta la fibrosis pulmonar como el efecto adverso de mayor gravedad.

En la tabla 3 se describen las incidencias de las reacciones adversas extracardíacas de la amiodarona.

Tabla 3 Incidencia de reacciones extracardíacas de amiodarona

Reacción adversa a medicamento	Incidencia (%)
Microdepósitos corneales	> 90
Coloración en piel gris-azul	4-9
Fotosensibilidad	25-75
Hipotiroidismo	6
Hipertiroidismo	0.9-2
Toxicidad pulmonar	1-17
Hepatotoxicidad	15-30
Cirrosis hepática	< 3

24

Los efectos adversos del medicamento han sido reportados que muestran una relación lineal con la cantidad acumulada y no se ha podido establecer la relación de la aparición de los mismos con la concentración plasmática del fármaco ni de su metabolito. Otros estudios han tratado de relacionar los efectos de toxicidad extracardíacos y las concentraciones de la amiodarona y la desetilamiodarona en diferentes tejidos, con el fin de proponer algún marcador de toxicidad, sin

embargo, por diversas razones no se ha reportado algún parámetro determinante.²⁵

Se ha demostrado en diversos ensayos *in vitro* que la amiodarona y la desetilamiodarona son fuertes inhibidores de la cadena de transporte de electrones asociadas a la producción de Especies Reactivas del Oxígeno.²² Los mecanismos de toxicidad de la amiodarona aún no han sido completamente descritos y los efectos adversos parecen estar relacionados a una fosfolipidosis en los tejidos de alta afinidad a las moléculas, siendo estos los de carácter lipofílico.²¹

Con el fin de conocer la relación que existe entre los efectos terapéuticos o tóxicos del fármaco y su metabolito, es necesario conocer la cantidad o concentración real que existe en los diversos compartimentos farmacocinéticos en diferentes condiciones: en pacientes en terapia con una patología controlada por amiodarona, así como en quienes la terapia con este antiarrítmico no esté siendo efectiva, quienes presenten un efecto terapéutico esperado y alguno de las reacciones adversas o solamente un efecto relacionado a la toxicidad.^{25,26}

Para la cuantificación de un fármaco en diferentes fluidos biológicos de interés clínico es necesaria la implementación de un método bioanalítico y para asegurar la confiabilidad de los resultados el método debe ser validado según las guías de validación bioanalíticas actuales.²⁷

1.6 Validación de métodos bioanalíticos

Para determinar las concentraciones tanto de fármacos como de metabolitos, son necesarios pretratamientos eficientes de extracción de las matrices biológicas y métodos sensibles y de alta resolución como HPLC asociada a los detectores correspondientes según las propiedades fisicoquímicas de los analitos. Existen diferentes Normas Oficiales para las validaciones bioanalíticas: en México existe la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, define las pruebas y procedimientos para establecer que un medicamento es intercambiable e incluye los parámetros para comprobar que un método es apto para el uso indicado.

La validación es el proceso por el cual se establece, mediante las características de desempeño del método analítico que debe cumplir para las aplicaciones previstas, se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso adecuado, se describe la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir. Los métodos bioanalíticos pueden tener diferentes objetivos como establecer la presencia, identificar o cuantificar el analito como lo fue en este proyecto.

Las validaciones constan de una serie de parámetros que deben ser evaluados cronológicamente con equipos calibrados adecuadamente, estándares

confiables de alta pureza, analistas con experiencia, además de documentar el procedimiento. Los parámetros determinados fueron los siguientes:

1.6.1 Selectividad

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito, en presencia de otros compuestos de la muestra.

1.6.2 Límite Inferior de Cuantificación

Es la menor concentración del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.

1.6.3 Curva de Calibración

Es el conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto a analizar.

1.6.4 Precisión

Se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una

muestra homogénea, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad, según la agencia reguladora en México.

1.6.4.1 Repetibilidad

Es la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de trabajo.

1.6.4.2 Reproducibilidad

Es la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio, en diferentes días, diferentes analistas o diferentes equipos.

1.6.5 Exactitud

Está definida como la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

1.6.6 Estabilidad de la muestra

Es la capacidad de un fármaco o biofármaco de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, es la propiedad del compuesto por analizar contenido en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras así como reanálisis.

2. ANTECEDENTES

La validación bioanalítica es uno de los aspectos de mayor importancia en la determinación de fármacos en matrices biológicas, para lo cual existen diferentes agencias reguladoras que indican en las guías el procedimiento para la validación de un método bioanalítico, en Europa la EMA lo establece en la *Guideline of bioanalytical method validation*,³⁸ en este proyecto se consultaron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, incluyendo en el apartado 9 los criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas establecidos para un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia, en el que menciona todos los parámetros para la determinación de fármacos en matrices biológicas.³⁹

Maes y colaboradores desarrollaron un método bioanalítico para la determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma de origen animal, la técnica de separación y cuantificación fue en cromatografía líquida asociada a un detector de masas, en la metodología de extracción utilizaron cartuchos SPE (*Solid Phase Extraction*), emplearon una columna cromatográfica Hypersil ODS para compuestos básicos no polares. Buenos parámetros de validación fueron obtenidos, como un LIC (Límite Inferior de Cuantificación) de la Curva de Calibración de 50 ng mL⁻¹ y tiempos de retención menores de 10 min para ambas moléculas, el intervalo de trabajo de la Curva de Calibración fue de 50 a 1000 ng mL⁻¹, evaluaron la precisión y la exactitud del método concluyendo los parámetros

y condiciones reportadas son aptas para la evaluación de los analitos en muestras de pacientes.³⁴

Kuhn y colaboradores desarrollaron un método de cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma humano empleando cromatografía líquida asociada a un detector de masas, en la metodología de extracción emplearon cartuchos SPE, la columna cromatográfica usada fue una *Hydro* de fase reversa, el LIC de la Curva de Calibración fue de $7.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la amiodarona y $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la desetilamiodrona, los tiempos de retención fueron menores a 3 minutos, el intervalo de trabajo de la Curva de Calibración reportada fue del LIC de la Curva de Calibración hasta $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$, la precisión y la exactitud también fueron evaluadas, por lo que las condiciones de trabajo de estos autores son potencialmente aplicables en la determinación de las moléculas en muestras de pacientes.³⁵

Rodrigues y colaboradores desarrollaron un método de cuantificación de amiodarona y su metabolito en plasma y tejidos de origen animal, por cromatografía líquida acoplada a un detector Ultravioleta-Visible, utilizaron una metodología de extracción LLE (*Liquid Liquid Extraction*) empleando una columna C18 de fase reversa, los LIC de la Curva de Calibración fueron de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, el intervalo de trabajo fue de 0.1 a $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas moléculas en las diferentes matrices, la precisión y la exactitud también fueron evaluadas por lo que se concluyó que las condiciones de trabajo reportadas pueden ser útiles en la determinación de estas moléculas en aplicaciones clínicas.³⁶

Rodrigues y colaboradores en un estudio posterior publicaron la validación bioanalítica para la cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona, la técnica de separación y cuantificación fue cromatografía líquida acoplada a un detector Ultravioleta-Visible, la extracción de los analitos del plasma fue SPE, el LIC de la Curva de Calibración fue de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, el intervalo de trabajo de la Curva de Calibración fue de 0.1 a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para las dos moléculas, la precisión y la exactitud también fueron evaluadas, los autores concluyen que la metodología desarrollada es aplicable en estudios de determinación de bioequivalencia.³⁷

Tras el uso de algunos medicamentos de farmacocinética complicada, fue evidente la necesidad de investigar sus concentraciones plasmáticas y de esta manera se establecieron las relaciones dosis-respuesta y surgió la importancia de la TDM con el objetivo de optimizar los tratamientos farmacológicos. La TDM se fundamenta en que existe una relación directa entre la concentración del fármaco en sangre y en los receptores, lo que determina el efecto terapéutico.² Para los medicamentos a los que se les ha descrito un amplio margen de seguridad no es adecuado el monitoreo de fármacos, ya que incluso genera un gasto económico no necesario, para los citotóxicos y algunos otros el empleo de criterios clínicos o pruebas alternativas pueden ser de mayor representación que la concentración como indicador de eficiencia del medicamento sin embargo, la TDM es necesaria y justificada para fármacos de estrecho margen de seguridad o como amiodarona un fármaco de cinética complicada.

Los estudios de monitorización de la amiodarona y la desetilamiodarona han sido realizados con el objetivo de correlacionar la concentración plasmática y el efecto terapéutico, sin embargo no se han reportado resultados concluyentes de las relaciones buscadas. En un estudio realizado en un grupo de 21 pacientes, Barbieri y colaboradores cuantificaron amiodarona y desetilamiodarona en tejido cardíaco, plasma y tejido adiposo humano *post mortem* de pacientes que estuvieron en terapia de corto y largo plazo, con el fin de investigar la bioacumulación en el periodo del estadio estacionario, las concentraciones de ambas moléculas fueron mayores en los pacientes con una larga terapia de amiodarona, aunque reportaron diferentes particularidades entre los diversos reservorios estudiados y los grupos de pacientes: la concentración de la desetilamiodarona en plasma fue del doble en pacientes en un largo periodo de terapia, contrario a los pacientes con un corto tiempo; por otro lado reportaron que la amiodarona tiene una mayor afinidad en plasma y tejido graso mientras la desetilamiodarona preferentemente se acumula en tejido cardíaco para los pacientes en terapia de corto y largo plazo, por lo cual los autores concluyeron que el tejido adiposo es el principal reservorio de amiodarona en tratamiento a largo plazo.⁴⁰

Diversas determinaciones en diferentes matrices han sido realizadas en busca de un depósito farmacocinético que pueda ser asociado a los efectos adversos extracardíacos, Heger y colaboradores estudiaron 55 pacientes en terapia oral de amiodarona y cuantificaron el fármaco y su metabolito en plasma y eritrocitos. Reportaron que existe una correlación entre las concentraciones intraindividuales

de amiodarona y desetilamiodarona en plasma. Sin embargo, encontraron que la concentración de la amiodarona fue menor en los eritrocitos que en el plasma, contrario a lo que sucedió con la desetilamiodarona, ya que aparenta tener una ligera mayor afinidad en los glóbulos rojos, por lo que este podría ser un compartimento farmacocinético significativo para la desetilamiodarona, lo que permitiría buscar una asociación de su concentración con los efectos adversos.⁴¹

Han sido realizados diversos estudios similares ante el gran número de reportes de reacciones adversas extracardíacas asociadas a amiodarona. Maling y colaboradores estudiaron 27 pacientes en terapia antiarrítmica con el fármaco de interés y cuantificaron el fármaco y su metabolito en el plasma y los eritrocitos, con relación a la presencia o ausencia de efectos de toxicidad, sus resultados indicaron que existen asociaciones: entre la dosis del medicamento y la concentración plasmática del fármaco y del metabolito, así como entre la dosis del fármaco y la concentración en los eritrocitos. También fue reportado que la concentración de la desetilamiodarona fue más alta en los eritrocitos que en el plasma.⁴²

Otros estudios cuantificaron amiodarona y desetilamiodarona en diferentes muestras biológicas, encontrando que el plasma y el tejido adiposo subcutáneo son los principales compartimentos de distribución del fármaco y el principal metabolito. Lafuente y colaboradores reclutaron 30 pacientes en terapia crónica oral de más de tres meses con amiodarona, tomaron muestras de sangre y tejido adiposo subcutáneo mediante una punción abdominal por aspiración para

determinar las concentraciones del fármaco y del metabolito en los dos compartimentos farmacocinéticos. Los resultados los compararon entre diferentes variables: como la presencia o ausencia de efectos adversos y la concentración de las matrices biológicas, el tiempo de terapia con el medicamento y las frecuencias de efectos adversos, concentraciones plasmáticas y concentraciones en tejido adiposo de manera intraindividual, dosis diaria y concentraciones en los fluidos analizados. Finalmente concluyeron que para el número de pacientes analizados no existe una diferencia entre las concentraciones en el plasma y el tejido adiposo que pueda indicar la presencia de un efecto adverso tardío, también concluyen que existe una diferencia estadística significativa indicando una asociación entre los efectos adversos y dosis diaria acumulada, por lo que siguen siendo necesarios estudios que continúen realizando las determinaciones de ambas moléculas en búsqueda de un posible marcador de toxicidad para prevenir los efectos adversos relacionados al medicamento.²⁵

Hasta ahora las reacciones adversas extracardíacas relacionadas a la amiodarona no se monitorizan adecuadamente, Rankin y colaboradores en un estudio retrospectivo de 1413 pacientes analizaron los datos con relación a la prescripción y la incidencia de reacciones adversas por un periodo de 6 meses, encontraron que aproximadamente el 46% de los pacientes contaban con datos de laboratorio para algún marcador de toxicidad en hígado y 62% contaban con estudios de toxicidad tiroidea, el resto no contaba con ningún marcador de toxicidad.⁴³ En otro estudio en pacientes que presentaron reacciones adversas

extracardíacas realizado por Reader y colaboradores encontraron que el 8.3% de 217 pacientes descontinuaron el tratamiento con amiodarona por la aparición de reacciones adversas,⁴⁴ por lo cual conocer la relación entre la concentración de fármaco, el metabolito y los efectos adversos sigue siendo un tema importante en el tratamiento con este medicamento.

Debido a la dificultad de relacionar las concentraciones de la amiodarona y la desetilamiodarona con la eficacia terapéutica, se ha intentado buscar una asociación entre las reacciones adversas y sus concentraciones en diferentes tejidos. Hrudikova y colaboradores han sugerido que la preferente afinidad de la desetilamiodarona hacia los eritrocitos, y de la amiodarona por el plasma, pudiera servir como marcador de toxicidad para el fármaco, además de que otra alternativa de prevenir efectos adversos extracardíacos sería estableciendo concentraciones individuales en la respuesta terapéutica alcanzada²⁶

Considerando la gravedad de los efectos adversos extracardíacos relacionados con la toxicidad en los diferentes ensayos clínicos, en diferentes objetivos se tratado de describir parámetro determinante para prevenir la toxicidad ocasionada por amiodarona con pacientes con terapia crónica vía oral, se ha sugerido que cuantificar desetilamiodarona en eritrocitos podría relacionarse con la aparición de dichos efectos adversos, sin embargo los resultados a pesar de indicar una tendencia, no son concluyentes por lo que se aconseja aumentar el número de pacientes ensayados, además de que en diferentes áreas demográficas los parámetros farmacocinéticos tienden a variar así como los

efectos adversos por factores propios de los pacientes. Otra situación de gran interés en los pacientes bajo tratamiento con amiodarona es la monitorización de marcadores de toxicidad como lo son: marcadores de toxicidad tiroideos y hepáticos, se ha sugerido que al inicio del tratamiento se realice un perfil tiroideo y hepático con el fin de establecer niveles basales para compararlos en el transcurso de la terapia, y de esta manera tomar la decisión de ajustar las dosis del antiarrítmico.

Debido a la aparente participación del principal metabolito en los efectos electrofisiológicos, la desetilamiodarona ha sido estudiada con el fin de describir la relación en los mecanismos de toxicidad. Estudios *in vitro* con el objetivo de relacionar la concentración de la amiodarona y la desetilamiodarona con la toxicidad por el fármaco han sido previamente reportados, varios derivados análogos de la molécula fueron probados con el fin de conocer cuál parte de esta adicionaba toxicidad y cuál exhibía menor toxicidad mitocondrial con la misma actividad antiarrítmica, Waldhauser y colaboradores publicaron que el anillo benzofurano en presencia de átomos de Yodo era relevante en la toxicidad mitocondrial, cuya estructura se presenta en la figura 1.

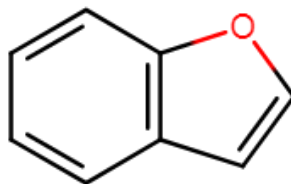


Figura 1 Benzofurano

Los resultados mostraron que todos los derivados presentaron patrones similares de toxicidad, sin embargo en el ensayo sobre el mecanismo de apoptosis/necrosis, la amiodarona indujo mayor grado de apoptosis que la desetilamiodarona, contrario a lo que pasó evaluando la necrosis, lo que significa que la desetilamiodarona induce con mayor agresividad la muerte celular que la amiodarona.²⁸

Se han realizado diferentes estudios en modelos celulares y animales tratando de explicar con mayor especificidad la toxicidad de la amiodarona y la desetilamiodarona, Zahno y colaboradores estudiaron el impacto del fármaco y el principal metabolito en una línea celular de hígado involucrando el metabolismo del polimorfismo *CYP3A4*, ya que este citocromo es el principal asociado con la desalquilación de la molécula. El resultado fue que las células con sobreexpresión de *CYP3A4* tuvieron un mayor grado de citotoxicidad que las que no fueron sobreexpresadas para tal citocromo, lo que indica que el metabolismo de la amiodarona forma un compuesto con mayor actividad citotóxica que la molécula original. Ambos compuestos también fueron cuantificados por HPLC y desetilamiodarona fue detectada en los cultivos celulares de 24 horas previamente inducidos para *CYP3A4*, lo cual indica que la citotoxicidad está asociada a la presencia de este metabolito.²²

Se ha sugerido que el metabolismo de algunos fármacos puede inducir la reactividad del sistema inmune innato, desencadenando reacciones adversas por

toxicidad. Endo y colaboradores probaron el efecto del citocromo P450 isoforma *CYP3A4* relacionándolo con la posible hepatotoxicidad inducida por una respuesta inmune, los resultados indicaron que la amiodarona en presencia de supersomas de *CYP3A4* en monocitos TPH-1 induce la expresión de la proteína de superficie CD54, proteína que favorece la adhesión de los monocitos en el endotelio induciendo diapédesis así como la expresión y liberación de interleucinas proinflamatorias; posiblemente el metabolito de la amiodarona contribuye a la inducción del sistema inmune en la activación de los monocitos, volviéndolos más reactivos contribuyendo a una respuesta tóxica al expresar las proteínas de superficie CD54, además de que la isoforma *CYP3A4* pudiera ser un factor de riesgo para el desarrollo de reacciones adversas en el tejido del sistema respiratorio.²⁹

Un estudio similar en el que se buscó el efecto de amiodarona sobre células de hígado por la inducción de varios tipos de CYP fueron evaluados (*1A1*, *1A2*, *1B1*, *2A6*, *2B6*, *2C8*, *2C9*, *2C18*, *2C19*, *2D6*, *2E1*, *3A4* y *3A7*). Xuan y colaboradores reportaron que una concentración plasmática de 0.85 µM es alcanzada en terapia crónica de 400 mg cada 24 horas; una significativa citotoxicidad en las células de hígado fue observada hasta 12.5 µM, por lo que este dato difícilmente se podría relacionar ante el 14-82% de prevalencia de alteración de la función hepática en los pacientes con una terapia habitual por la amiodarona. En el mismo estudio, la citotoxicidad fue evaluada por la inhibición y la expresión de los CYP ensayados, se encontró que las isoformas pueden tener un efecto opuesto metabólicamente, ya que mientras la sobreexpresión de CYP *1A1* y *3A4*

potencian el efecto citotóxico de la amiodarona, la sobreexpresión de las isoformas CYP 1A2, 3A5 y 3A7 reducen tal efecto. También reportaron la actividad de otras isoformas CYP en el metabolismo de la desetilamiodarona, que disminuyeron la citotoxicidad en la línea celular, como los son: 1A2, 2C8, 2C19 y 2D6, se sugiere que pueden contribuir a la detoxificación de desetilamiodarona por hidroxilación, desalquilación o desaminación.³⁰ Quiangen y colaboradores en ensayos similares, probaron diferentes isoformas del citocromo, encontrando que las isoformas CYP 1A1, 3A4 y 3A5 eran las principales convertidoras de la amiodarona a la desetilamiodarona.²¹

También se han estudiado los efectos de citotoxicidad en modelos celulares de pulmón HPL1A, Roth y colaboradores mencionan que se puede presentar un posible sinergismo citotóxico entre la amiodarona y la desetilamiodarona en tejido pulmonar. Mientras la amiodarona induce muerte celular por la vía necrótica, la desetilamiodarona activa las vías apoptóticas desde menores concentraciones que el fármaco. También reportaron un isoblograma de citotoxicidad, donde se describen las concentraciones a las cuales el 50% del cultivo presenta muerte celular y demostraron que la citotoxicidad de desetilamiodarona es dos veces mayor a la exhibida por la amiodarona. Finalmente los autores concluyen que el empleo de un isoblograma es una importante herramienta que podría determinar el efecto de sinergismo en interacciones medicamentosas.¹⁹ Estos mismos estudios celulares han sido realizados con el fin de conocer el mecanismo de desarrollo de toxicidad pulmonar ocasionado por la amiodarona, recientes estudios reportan que la Ang II (angiotensina) induce apoptosis en las

células epiteliales alveolares, por lo que surge la posibilidad de que la amiodarona y la Ang II podrían tener una participación en el desarrollo de dicha reacción adversa.³¹

Un estudio similar realizado por Mulder y colaboradores en células HPLA1 derivadas de tejido pulmonar, en búsqueda del mecanismo de muerte celular, muestra los porcentajes de apoptosis y necrosis, los autores reportaron que la desetilamiodarona tiene una mayor actividad citotóxica que la amiodarona, adicionalmente encontraron que las células expuestas a la desetilamiodarona exhiben altos niveles de mRNA para angiotensinógeno, previamente había sido reportado que el angiotensinógeno podría participar en el desarrollo de toxicidad pulmonar, ya que induce cambios en los alvéolos y apoptosis ocasionando fibrosis pulmonar, lo cual podría ser un punto de partida para el desarrollo de neumonía ocasionada por amiodarona.³²

Estudios recientes consideraron que el desarrollo de reacciones adversas extracardíacas por la amiodarona estaban asociadas con la cantidad y duración del tratamiento, relacionado a la posibilidad de que el sistema inmune pueda tener una importante participación. Santos y colaboradores administraron amiodarona en dos concentraciones vía oral a dos grupos de ratones por 5 días, posteriormente tomaron biopsias de pulmón para medir la elasticidad indicando el desarrollo de colágeno por inducción por la amiodarona, el resultado fue que en los grupos a los que se les administró el fármaco las fibras de colágeno aumentaron en tamaño.³³

Considerando los ensayos antes mencionados, desetilamiodarona es el principal metabolito de amiodarona, en conjunto con amiodarona inducen una considerable serie de efectos citotóxicos, en representación de los tejidos de los órganos de mayor grado de toxicidad reportados a nivel clínico, es por esta razón que es considerablemente importante conocer la concentración de ambas moléculas en los diferentes compartimentos farmacocinéticos para buscar una relación entre los efectos adversos y la concentración. Con el fin de conocer las concentraciones de las moléculas de interés en diferentes matrices biológicas, varios métodos de extracción y de cuantificación se han realizado, obteniéndose diferentes ventajas según el objetivo de cada tipo de estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

La farmacocinética clínica es una de las ciencias interdisciplinarias que contribuyen en el sistema de salud, la individualización posológica es uno de los principales objetivos en los tratamientos farmacoterapéuticos, con el fin de aumentar la efectividad y disminuir la toxicidad. Algunas de las ventajas que ofrece la Monitorización Terapéutica de Medicamentos son: el ajustar de las dosis, proponer frecuencias de administración, detectar concentraciones plasmáticas subterapéuticas, concentraciones tóxicas, interacciones medicamentosas y fracasos terapéuticos, entre otras. Considerando la relación riesgo/beneficio solo algunos medicamentos son candidatos a ser cuantificados en fluidos biológicos, ya que el resultado puede influir en el ajuste de la posología permitiendo una farmacoterapia individualizada. En los ambientes hospitalarios en México es una de las ciencias de gran interés, aunque no totalmente desarrolladas, ya que en el sentido económico podría ser una fuente de ingresos para las Instituciones además de la mejora de la calidad de vida de los derechohabientes.

Los estudios *in vitro* reportados en diferentes condiciones y líneas celulares coinciden en que amiodarona y desetilamiodarona inducen en conjunto un grado de citotoxicidad mayor que el que puedan mostrar de manera independiente, sin embargo, también es importante mencionar que la desetilamiodarona a bajas

concentraciones causa el mismo grado de muerte celular que la amiodarona, por lo que probablemente los efectos adversos podrían ser relacionados a las concentraciones de las moléculas determinadas de manera simultánea.

Actualmente la Monitorización Terapéutica de Medicamentos no es un servicio rutinario proporcionado en los hospitales, por lo que importantes recursos económicos no contemplados en la recuperación de la enfermedad podrían evitarse y ofrecer significativas ventajas, es por estas razones que en el presente trabajo se pretende proponer un marcador de toxicidad en el tratamiento crónico con amiodarona, previniendo importantes efectos adversos extracardíacos sin discontinuar la terapia.

4. HIPÓTESIS

La desetilamiodarona muestra una mayor afinidad por eritrocitos y la amiodarona por plasma en pacientes con terapia crónica oral.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar las concentraciones de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos como marcadores de toxicidad extracardíaca y promover el uso racional del fármaco.

5.1 Objetivos específicos:

- 5.1.1 Validar un método analítico para la determinación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona por HPLC UV-Vis en tejido graso subcutáneo, eritrocitos y plasma.
- 5.1.2 Determinar la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en pacientes con terapia crónica oral en plasma y eritrocitos.
- 5.1.3 Reconocer la frecuencia y el tipo de reacciones adversas en los pacientes estudiados.

5.1.4 Establecer la asociación de los parámetros analizados con los efectos adversos encontrados en dos grupos de pacientes: con y sin efectos adversos.

6. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPOS

6.1 Material de uso hospitalario

- Tubo Vacutainer 6 mL K₂EDTA
- Aguja Vacutainer
- Algodón
- Etanol 70%

6.2 Reactivos y material de uso en método analítico

- Tubo eppendorf
- Inserto vial HPLC
- Vial HPLC
- Punta 100 µL
- Punta 1000 µL
- Metanol HPLC
- Acetonitrilo HPLC
- Agua HPLC
- Agua destilada
- Acetato de amonio
- Ácido acético glacial

- Hexano HPLC
- Amiodarona 98.0% pureza, Sigma-Aldrich®
- Desetilamiodarona 95.0% pureza, BOC Scientific®
- Cloruro de sodio
- Acetato de amonio

6.3 Equipos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Waters modelo 2695, acoplado a detector de arreglo de fotodiodos UV-Vis Waters modelo 2996 (Laboratorio de Biofarmacia)
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Perkin-Elmer modelo Series 200 acoplado a un detector arreglo de fotodiodos UV-Vis PerkinElmer modelo Series 200 (Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental)
- Espectrofotómetro UV-Vis VARIAN modelo Cary 50 Bio.
- Sonicador Branson modelo 2510
- Balanza analítica AND modelo HR-200
- Vórtex Thermolyne Maxi Mix plus modelo M63215
- Centrífuga Eppendorf modelo 5415D
- Centrífuga refrigerada Thermo modelo Centra CL3R

7. METODOLOGÍA

7.1 Ubicación de los equipos

Los equipos con los que fue desarrollado este proyecto se encuentran ubicados en las instalaciones del Laboratorio de Biofarmacia y el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.1.1 Desarrollo de condiciones cromatográficas

Previo al ajuste de las condiciones cromatográficas, una solución metanólica de amiodarona y otra de desetilamiodarona de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada una fueron preparadas para identificar la longitud de máxima absorción en el espectro Ultravioleta-Visible entre 200 y 400 nm.

Una solución de amiodarona y otra de desetilamiodarona en metanol a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada una, fueron inyectadas por separado en el cromatógrafo con el fin de identificar los tiempos de retención de los estándares. Otra solución metanólica mixta de amiodarona y desetilamiodarona de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue preparada para una inyección al cromatógrafo para comprobar una completa resolución de los picos cromatográficos de ambos analitos.

La columna cromatográfica empleada en este estudio fue fase reversa C18, con dimensiones de 250 x 4.6 mm y 5 μm de diámetro de poro de la marca Phenomenex, la fase móvil estuvo compuesta por 60% de acetonitrilo, 30% de metanol y 10% de buffer de acetatos 100 mM a pH 4.5, un flujo continuo de 2 ml min^{-1} . El volumen de inyección de la muestra fue de 45 μL con un tiempo total de corrida de 12 min, registrando en el espectro ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm para ambos analitos. Estas condiciones fueron adaptadas de estudios anteriores del mismo grupo de trabajo.

7.1.2 Obtención de matrices biológicas libres de fármaco

Las muestras fueron obtenidas por una toma de muestra de sangre completa en tubo con K_2EDTA como anticoagulante de seis voluntarios aparentemente sanos. La sangre fue centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos, el plasma fue separado del paquete globular y combinado con el plasma de los diferentes voluntarios para formar un concentrado. El paquete globular fue lavado de manera independiente con solución salina 0.9% por triplicado, fue adicionado un volumen igual de agua destilada con el fin de hemolizar la muestra, este lisado eritrocitario fue combinado con los otros lisados.

El tejido adiposo subcutáneo, fue donado por Investigadores de la Sección de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, el tejido adiposo subcutáneo fue lavado con solución salina por triplicado y

utilizado como matriz libre de fármaco y adicionado con analitos según los parámetros especificados de la validación bioanalítica.

7.1.3 Extracción simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Para obtener la mejor eficiencia de extracción en las matrices biológicas estudiadas, fueron probadas tres metodologías, para esto se preparó una solución patrón de una mezcla de amiodarona y desetilamiodarona de $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de la cual se elaboraron diluciones de 10 y $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol. Posteriormente se prepararon estándares de 0.5 y $2.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ en las matrices correspondientes (una muestra de alta y baja concentración de la mezcla de analitos) cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana de un máximo de 5% de empleo de solvente en la matriz para adicionar fármaco.

Una de las metodologías ensayadas consistió en mezclar: un volumen de $600\ \mu\text{L}$ de plasma y de lisado eritrocitario, con $400\ \mu\text{L}$ de buffer de acetatos $100\ \text{mM}$ a un pH de 4.5 , la mezcla se homogenizó por $30\ \text{s}$ en vórtex y posteriormente se realizó una extracción con $500\ \mu\text{L}$ de hexano, para el tejido adiposo subcutáneo $0.5\ \text{g}$ fueron pesados en balanza analítica, el resto del procedimiento fue similar al utilizado con las otras matrices. La fase orgánica de las mezclas fue recuperada, evaporada y el precipitado fue reconstituido en $200\ \mu\text{L}$ de metanol para inyección en el cromatógrafo.

La segunda metodología de extracción ensayada consistió en mezclar, 600 μ L de plasma y lisado eritrocitario con 1800 μ L de acetonitrilo para precipitar las proteínas y funcionando como agente extrayente. El tejido adiposo subcutáneo fue pesado en balanza analítica, 0.5 g fueron procesados por la misma metodología empleada con las otras matrices. Posteriormente las muestras fueron homogenizadas en vórtex por 30 s y centrifugadas a 13 mil rpm por 5 min, el sobrenadante de acetonitrilo fue recuperado como extracto para la inyección al cromatógrafo.

La última metodología se llevó a cabo con 600 μ L de plasma y lisado eritrocitario, a los que se les adicionaron 400 μ L de acetonitrilo como precipitante de proteínas, se agitó en vórtex por 30 s y se centrifugaron a 13 mil rpm por 5 min, el acetonitrilo fue recuperado y posteriormente 2000 μ L de hexano fueron agregados sobre el acetonitrilo como agente extrayente.

El tejido adiposo subcutáneo fue pesado a 0.5 g en un tubo de ensaye, el procedimiento fue similar al utilizado con otras matrices, sin embargo, para favorecer la separación de las fases tras la adición de acetonitrilo la muestra fue sometida a tres ciclos de calentamiento de 15 min a 40 °C con el fin de homogenizar el tejido en el acetonitrilo agitando en vórtex en cada ciclo, finalmente la mezcla fue centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos y refrigerada a 4 °C durante 15 min, lo cual favoreció la solidificación de los componentes del tejido y permitió una mejor recuperación del acetonitrilo. El acetonitrilo fue recuperado y se sometió a extracción con hexano en las mismas condiciones del

procedimiento en plasma y lisado eritrocitario. La fase orgánica fue recuperada, y se adicionaron 500 μL de hexano sobre el tejido adiposo subcutáneo repitiendo el último paso. El hexano de las tres matrices fue evaporado y recuperado el precipitado, reconstituyéndose en 200 μL de metanol para la inyección en el cromatógrafo.

7.2 Validación de método bioanalítico

Las mediciones bioanalíticas se basaron en los criterios y requisitos del apartado 9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

La validación bioanalítica por la técnica de HPLC acoplada a un detector UV-Vis, se realizó en el Laboratorio de Biofarmacia en el Centro de Laboratorios Especializados y en el Laboratorio de Fotocatálisis y Electroquímica Ambiental del Departamento de Estudios de Posgrado en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.2.1 Validación de los métodos bioanalíticos para cuantificación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

A partir de los estándares de referencia una solución patrón mixta de amiodarona y desetilamiodarona a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ fue preparada. Posteriormente, de esta solución patrón fueron preparadas 8 diluciones para plasma y lisado eritrocitario

y 7 diluciones para tejido adiposo subcutáneo a una concentración 20 veces la concentración de cada punto de la Curva de Calibración y 3 diluciones más, a una concentración 20 veces la correspondiente a la MCB (Muestra Control Baja), MCM (Muestra Control Media) y MCA (Muestra Control Alta), el LIC de la Curva de Calibración fue al primer punto de cada Curva de Calibración fijada para cada matriz analizada. Las MC (Muestras Control) fueron seleccionadas a diferentes concentraciones de las muestras de la Curva de Calibración e incluidas en el intervalo de trabajo.

En la tabla 4 se muestran las concentraciones de las soluciones en metanol 20 veces concentradas correspondientes a cada uno de los puntos de la Curva de Calibración, LIC, MCB, MCM y MCA.

Tabla 4 Concentraciones de soluciones metanólicas 20x de la Curva de Calibración de plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Estándar de la Curva de Calibración	Sol 20x plasma ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sol 20x lisado eritrocitario ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sol 20x tejido adiposo subcutáneo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	2.5 (LIC)	2.5 (LIC)	- - -
2	10.0	10.0	20.0 (LIC)
3	20.0	20.0	50.0
4	50.0	50.0	100.0
5	100.0	100.0	200.0
6	200.0	200.0	300.0
7	300.0	300.0	400.0
8	400.0	400.0	600.0
MCB	30.0	30.0	30.0
MCM	160.0	160.0	160.0
MCA	360.0	360.0	360.0

Para la preparación de las Curvas de Calibración del plasma y el lisado eritrocitario se adicionó el 5% del volumen de las soluciones 20x y fue completado el volumen final con plasma y lisado eritrocitario respectivamente, para tejido adiposo subcutáneo se utilizó 5% en peso de las soluciones 20x.

En la tabla 5 se muestran las concentraciones correspondientes a cada uno de los puntos de la Curva de Calibración y los controles incluyendo el LIC de la Curva de Calibración.

Tabla 5 Concentraciones de soluciones de la Curva de Calibración y Límites Inferiores de Cuantificación en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Estándar de la Curva de Calibración	plasma ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	lisado eritrocitario ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	tejido adiposo subcutáneo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	0.125 (LIC)	0.125 (LIC)	- - -
2	0.5	0.5	1.0 (LIC)
3	1.0	1.0	2.5
4	2.5	2.5	5.0
5	5.0	5.0	10.0
6	10.0	10.0	15.0
7	15.0	15.0	20.0
8	20.0	20.0	30.0
MCB	1.5	1.5	1.5
MCM	8.0	8.0	8.0
MCA	18.0	18.0	18.0

7.2.1.1 Selectividad

Para demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, fueron evaluados mediante el uso de plasma y lisado eritrocitario de 6 diferentes voluntarios aparentemente sanos y la mezcla del tejido adiposo subcutáneo. Se buscaron interferencias a no más de un 20% del Límite Inferior de Cuantificación de la Curva de Calibración de la amiodarona y la desetilamiodarona.

Una muestra del concentrado de cada matriz biológica sin la adición de los analitos fue utilizada como blanco de matriz para comparar la respuesta analítica con muestras adicionadas con amiodarona y desetilamiodarona.

7.2.1.2 Límite inferior de cuantificación de la Curva de Calibración

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 el LIC de la Curva de Calibración se establece en el 5% de la $C_{\text{máx}}$ (Concentración máxima plasmática del estado estacionario) promedio del fármaco reportado de amiodarona a dosis habituales es de $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, por lo que el LIC de la Curva de Calibración, para este estudio correspondió a $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$, para el plasma y el lisado eritrocitario. Las concentraciones máximas reportadas de amiodarona en tejido adiposo subcutáneo son de 5.0 a $30 \mu\text{g g}^{-1}$ por lo cual en este estudio fue establecido el LIC de la Curva de Calibración en $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$, ya que la Norma Oficial Mexicana

consultada permite ajustar estos valores para moléculas de alta variabilidad farmacocinética como lo es la amiodarona.

7.2.1.3 Curva de calibración

Los puntos de la Curva de Calibración se establecieron de acuerdo a las concentraciones esperadas, las cuales fueron 0.125, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para amiodarona y desetilamiodarona en el plasma y el lisado eritrocitario, mientras que para el tejido adiposo subcutáneo fueron de 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 40.0 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Las muestras de la Curva de Calibración fueron caracterizadas con un método matemático de ajuste por mínimos cuadrados para relacionar la concentración y la respuesta analítica, la cual fue continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la Curva de Calibración. Las lecturas de las muestras de la Curva de Calibración fueron evaluadas por triplicado incluyendo los porcentajes de concentración recuperada así como el porcentaje de desviación para cada una de las matrices biológicas evaluadas.

7.2.1.4 Precisión

Se evaluó por repetibilidad y reproducibilidad en porciones de una muestra homogénea de plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

7.2.1.4.1 Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad de la técnica se analizó en un mismo día por quintuplicado las muestras control: LIC de la Curva de Calibración, MCB, MCM y MCA calculando la concentración obtenida para cada nivel y graficando su respuesta analítica en la Curva de Calibración. El criterio de aceptación para este parámetro fue evaluado con el CV% (Coeficiente de Variación) del valor promedio y no debió ser mayor al 15%, excepto para el LIC de la Curva de Calibración, el debió ser menor al 20%, siendo estos valores los límites en la Norma Oficial consultada

7.2.1.4.2 Reproducibilidad

Para determinar la reproducibilidad del método analítico se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las MC: LIC de la Curva de Calibración, MCB, MCM y MCA. También para cada MC, se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la Curva de Calibración. El criterio de aceptación para este parámetro fue evaluado por el valor promedio del CV% y no debió ser mayor al 15%, excepto para el LIC de la Curva de Calibración, el cual debió ser menor que el 20%, siendo estos valores los límites en la Norma Oficial consultada.

7.2.1.5 Exactitud

Para evaluar la exactitud de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación estándar de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de la desviación) empleando la siguiente ecuación:

$$\%desviación = \frac{(Concentración\ adicionada) - (Concentración\ obtenida)}{Concentración\ adicionada} \times 100$$

(A) Ecuación % de desviación

7.2.1.6 Estabilidad de la muestra

Para este parámetro se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo, en las que la amiodarona y la desetilamiodarona permanecen estables en las diferentes matrices biológicas estudiadas, durante el manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento bioanalítico. Las MC de baja y alta concentración fueron interpoladas en la Curva de Calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas fueron comparadas contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel quedó dentro del 15% de la concentración nominal.

7.2.1.6.1 Estabilidad a corto plazo

Se evaluó la estabilidad de la amiodarona y la desetilamiodarona en el plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra.

7.2.1.6.2 Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad de la amiodarona y la desetilamiodarona en las matrices biológicas, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las muestras, por un periodo correspondiente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

7.2.1.6.3 Estabilidad en el automuestreador

Se evaluó la estabilidad de la amiodarona y la desetilamiodarona en la muestra procesada a la temperatura y tiempo aproximado a los del automuestreador (tres horas a 23 °C).

7.2.1.6.4 Estabilidad durante los ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de la amiodarona y la desetilamiodarona en las matrices biológicas, almacenadas a la temperatura de congelación en que estuvieron las

muestras reales por al menos 12 horas, descongeladas completamente a la temperatura interior del laboratorio (23 °C) y nuevamente congeladas por al menos 12 horas bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación fue de tres.

7.2.2 Procedimientos en Unidad Clínica

El estudio se realizó en la UMAE (Unidad Médica de Alta Especialidad No 34) del IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) con base a la selección de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y no cumplieron los de exclusión.

Los pacientes derechohabientes del IMSS que acudieron a consulta externa que cumplieron los criterios de inclusión y no cumplieron los criterios de exclusión fueron reclutados, se les explicó el estudio al que se les invitó a participar así como el beneficio de conocer sus concentraciones en plasma y eritrocitos del fármaco y firmaron el consentimiento informado (Anexo-A), después se les aplicó una encuesta para obtener datos antropométricos y farmacoterapéuticos (Anexo-B). Al finalizar el estudio se entregó un reporte al médico encargado (Anexo-C) así como el análisis de su farmacoterapia.

7.2.2.1 Criterios de inclusión y exclusión

Se formó un grupo de pacientes, los que presentaron eventos adversos al inicio del estudio. La evaluación de los signos de toxicidad fueron valorados por historia clínica o pruebas de imagenología en colaboración con el personal de la Institución de salud. En la tabla 6 se muestran los criterios de inclusión y exclusión.

Tabla 6 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Mayor de 18 años de edad	Lesiones locales cutáneas
Terapia crónica vía oral por más de 3 meses	Infecciones que imposibiliten la venopunción
Firmar la carta de consentimiento informado	

Una muestra de sangre venosa fue recolectada en tubo cerrado al vacío con K₂EDTA, la muestra fue rotulada con el folio del consentimiento informado del paciente y la fecha de nacimiento, con el fin de identificarla adecuadamente, además de haber preservado la confidencialidad del paciente. La muestra fue resguardada en contenedores adecuados a baja temperatura permitiendo la adecuada integridad de los componentes de la sangre. La sangre fue centrifugada a 3 000 rpm por 5 minutos y separado el plasma en dos alícuotas, la primera de 1 mL y la segunda del resto del plasma en caso de existir la necesidad de repetir la cuantificación. Por otro lado el paquete globular fue lavado por triplicado con solución salina, los eritrocitos fueron medidos en volumen y se les adicionó el volumen correspondiente en proporción 1:2 con el fin de hemolizar

la muestra. Las muestras fueron congeladas a -20.0 °C hasta el momento de sus análisis.

Las muestras de plasma y lisado eritrocitario fueron descongeladas y procesadas por el método de mayor eficiencia, precipitando las proteínas con acetonitrilo y hexano como agente extrayente. El extracto fue inyectado al cromatógrafo de líquidos y la respuesta analítica comparada en la Curva de Calibración correspondiente, incluyendo las MC. Las concentraciones de los analitos fueron obtenidas por la sustitución matemática de la ecuación de la recta de cada matriz analizada.

$$y = mx + b$$

(B) Ecuación de la recta de Calibración

Donde:

y= respuesta analítica por el detector del cromatógrafo de líquidos (UA,

Unidades de área)

m= pendiente de la recta de calibración (UAmL μg^{-1} ó UAg μg^{-1})

x= concentración del analito ($\mu\text{g mL}^{-1}$ ó $\mu\text{g g}^{-1}$)

b=ordenada al origen

La estimación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en las diferentes matrices se hizo por el despeje de la ecuación de la variable “x” como incógnita mientras el valor conocido “y” siendo la respuesta del detector, quedando la siguiente ecuación.

$$x = \frac{y - b}{m}$$

(C) Despeje de la ecuación de la recta de calibración

De la cual se obtuvo como respuesta la concentración de los analitos en las muestras analizadas, para las muestras de lisado eritrocitario se multiplicó por el factor de dilución, ya que para la hemólisis se hizo una dilución 1:2 con agua destilada.

7.3 Análisis estadístico

Una prueba *t* de Student con un nivel de significancia del 95% fue utilizada para comparar las concentraciones medias de amiodarona y su metabolito en plasma y eritrocitos.

7.4 Disposición de residuos

La disposición de los residuos se hizo de acuerdo al reglamento interno de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La

fase móvil fue recuperada y colocada en el colector C: correspondiendo a tóxicos e inflamables, aminas y solventes orgánicos no halogenados. Los Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos o RPBI fueron procesados según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, de acuerdo con las características físicas y biológicas infecciosas, los objetos punzocortantes biológico-infecciosos como agujas, fueron depositados en el contenedor rojo rígido de polipropileno desechable de punzocortantes, los residuos líquidos de la sangre y el plasma fueron dispuestos en el recipiente hermético rojo, los residuos líquidos del tejido graso subcutáneo fueron colectados en el recipiente hermético amarillo y finalmente los residuos no anatómicos sólidos fueron contenidos en bolsas de polietileno rojo. Todos los RPBI generados fueron almacenados en las condiciones óptimas de almacenaje y temperatura, para ser procesados por el departamento de medio ambiente y seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo de condiciones cromatográficas

Como etapa preliminar a las extracciones una solución metanólica de amiodarona y desetilamiodarona a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ fueron preparadas, para identificar en el espectro Ultravioleta-Visible la longitud de máxima absorción entre 200 y 400 nm como rango de longitud de onda.

En la figura 2 se muestra el espectro de absorción entre 200-400 nm de una solución de amiodarona $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol.

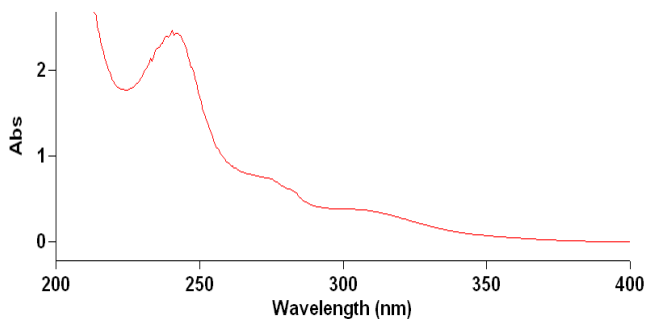


Figura 2 Espectro de AMD $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol

En la figura 3 se encuentra el espectro de absorción entre 200-400 nm de una solución de desetilamiodarona $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol.

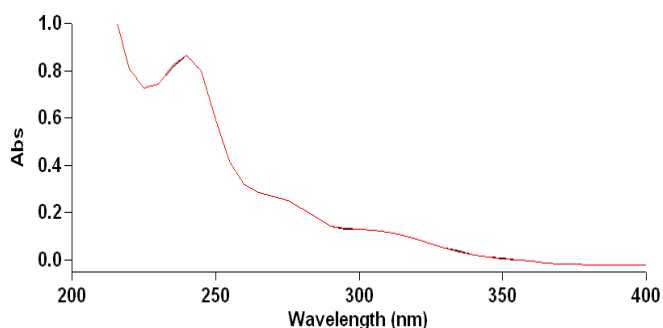


Figura 3 Espectro de DEA $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol

La longitud de onda de máxima absorción fue de 240 nm, correspondiendo a la región Ultravioleta-Visible del espectro electromagnético para ambas moléculas, lo cual coincide con previos experimentos por el mismo equipo de trabajo y por otros ensayos publicados con las mismas moléculas, aunque otros autores han cuantificado en 242 nm y 252 nm ya que la banda de absorción de los analitos es lo suficientemente amplia para lograr cuantificar en el rango de trabajo reportado.^{45–47}

En la figura 4 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de una solución metanólica de desetilamiodarona $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ con el fin de identificar el t_R (tiempo de retención).

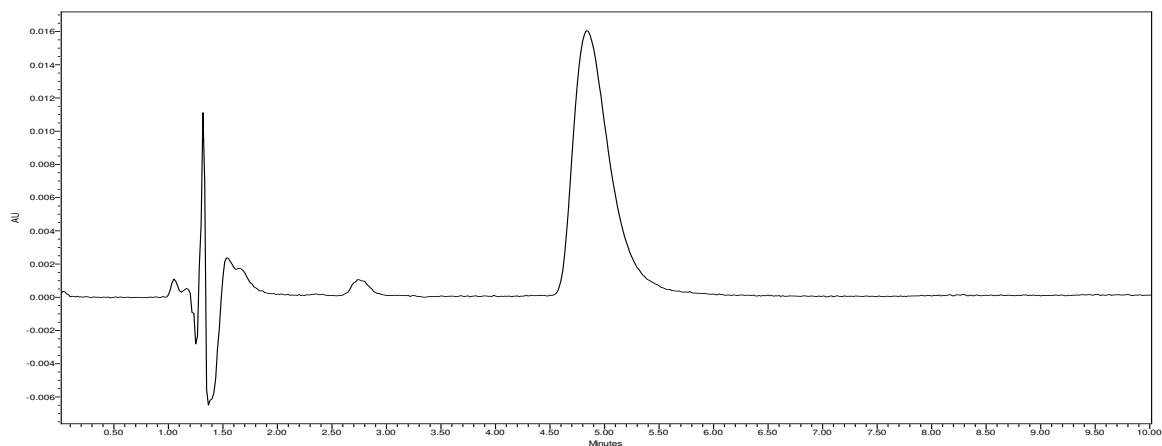


Figura 4 Cromatograma correspondiente a una solución de DEA (t_R : 5.6 min) a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol

En la figura 5 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de una solución metanólica de amiodarona $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ con el fin de identificar el t_R .

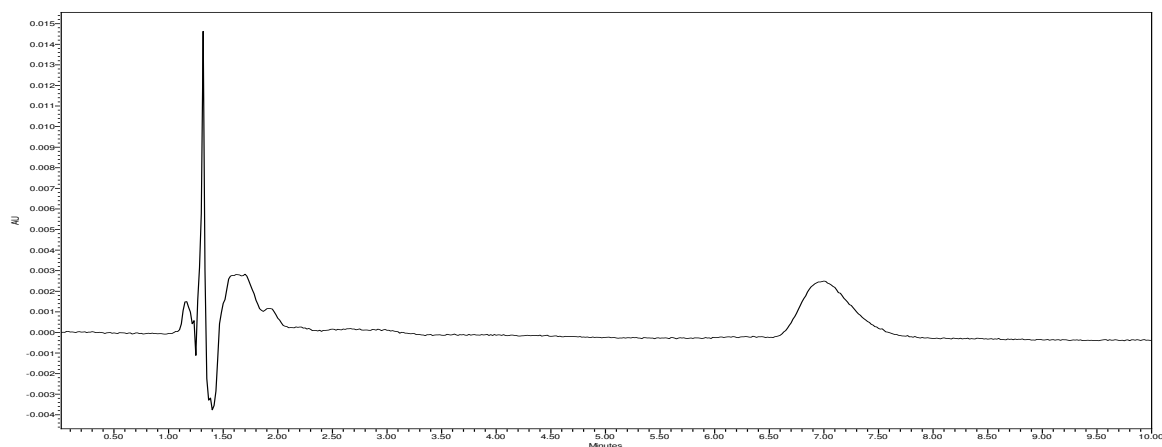


Figura 5 Cromatograma correspondiente a una solución de AMD (t_R : 9.2 min) a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol

En la figura 6 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de una solución metanólica mixta de amiodarona y desetilamiodarona a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito con el fin de demostrar la adecuada resolución de los picos cromatográficos correspondientes de los analitos.

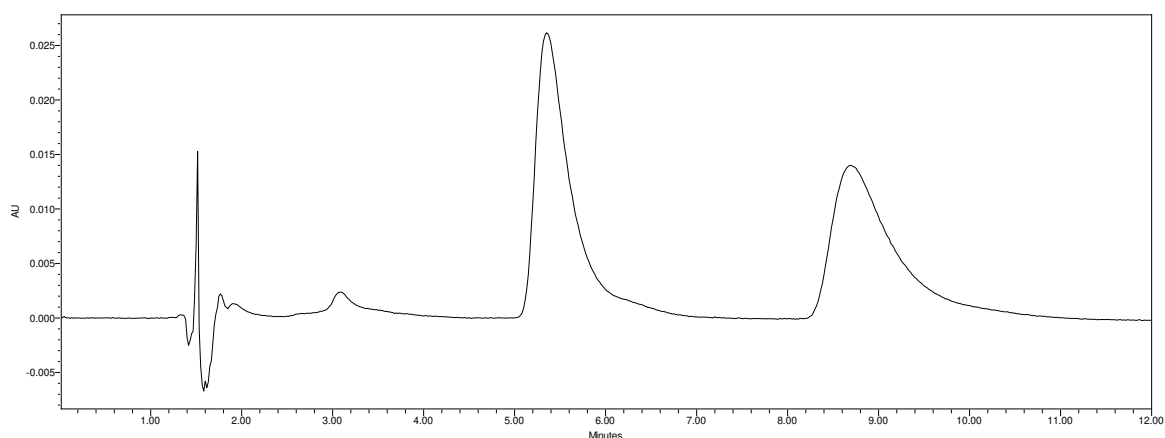


Figura 6 Cromatograma correspondiente a una mezcla de DEA (t_R : 5.6 min) y AMD (t_R : 9.2 min) a una concentración de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol

En las figuras 4, 5 y 6 se observa que el tiempo de retención de la desetilamiodarona fue de 5.6 min y el de la amiodarona de 9.2 min, quedando identificado estos tiempos de retención para las condiciones del análisis cromatográfico y fase móvil empleadas las cuales fueron: un flujo de 2 mL min^{-1} y una fase móvil compuesta por Acetonitrilo-Metanol-Buffer de acetatos 100 mM a un pH de 4.5 (60:30:10, v/v/v). También fue demostrado que para las mencionadas condiciones de trabajo, los picos cromatográficos de los analitos quedan resueltos adecuadamente. Los tiempos de retención son muy variables dependiendo de las condiciones de trabajo, al manejar columnas de longitud

larga, de fase estacionaria reversa los analitos tienden a retenerse y mostrar largos tiempos de retención, como es en el caso de la amiodarona y la desetilamiodarona. Los tiempos de retención de los analitos de este estudio mostraron una adecuada resolución, sin embargo otros autores han reportado tiempos de corridas cromatográficas para ambas moléculas tan solo de 5 min,³⁶ lo cual puede ser alcanzado por columnas cromatográficas de fase reversa de una menor longitud y un menor diámetro de poro, empleando cromatógrafos capaces de mantener altas presiones como son *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) y *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) por sus siglas en inglés, por lo que cada método de validación debe contar con sus variables ajustadas a las condiciones de trabajo y equipo disponible.

8.2 Extracción simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y lisado eritrocitario

Previo a los ensayos de eficiencia de extracción, fueron elaboradas una dilución de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y otra de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amiodarona y desetilamiodarona, a partir de una solución patrón mixta de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol. Dos muestras de 0.5 y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en las matrices correspondientes fueron elaboradas de las soluciones metanólicas preparadas previamente siendo una de alta y otra de baja concentración para ambos analitos.

Fue realizada una extracción, adicionando buffer de acetatos 100 mM a un pH de 4.5 a las matrices, para finalmente extraer con hexano, la fase orgánica hexánica fue recuperada y evaporada para ser reconstituída en 200 μ L de metanol e inyectado 45 μ L al cromatógrafo. El cromatograma obtenido de este procedimiento no fue satisfactorio para lograr integrar el área del pico cromatográfico formado por la señal analítica del detector Uv-Vis en los tiempos de retención de ambas moléculas.

El cromatograma obtenido del procedimiento por precipitación y extracción con acetonitrilo en proporción 1:4, no mostró picos cromatográficos presuntivos de los analitos, por lo que esta metodología no fue continuada.

De la metodología precipitando las proteínas con acetonitrilo y extracción con hexano: la fase orgánica fue recuperada y reconstituida en 200 μ L de metanol para ser inyectada al cromatógrafo. Dos picos cromatográficos fueron encontrados para los tiempos de retención de la amiodarona y la desetilamiodarona, por lo que esta metodología fue óptima para la extracción de los analitos.

En la figura 7 es mostrado el cromatograma obtenido de la inyección de un extracto de plasma que previamente fue adicionado con amiodarona y desetilamiodarona para ajustar una concentración de 1 μ g mL⁻¹ por la adición del 5% del volumen final.

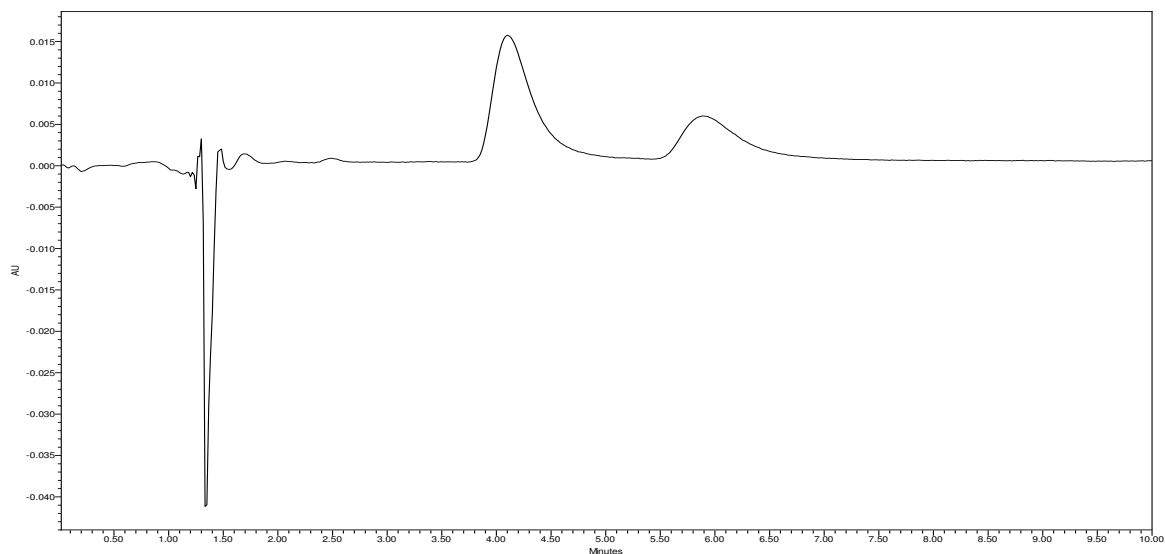


Figura 7 Cromatograma del extracto de DEA y AMD $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en plasma precipitando proteínas con acetonitrilo

En la figura 8 es mostrado el cromatograma obtenido de la inyección de un extracto de lisado eritrocitario que previamente fue adicionado con amiodarona y desetilamiodarona para ajustar una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ por la adición del 5% del volumen final.

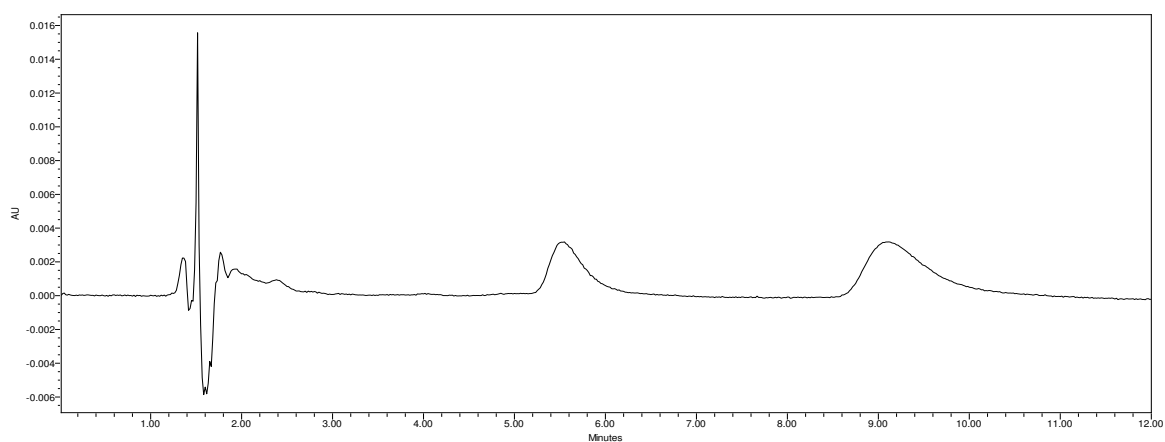


Figura 8 Cromatograma del extracto de DEA y AMD $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ en lisado eritrocitario precipitando proteínas con acetonitrilo

En la figura 9 es mostrado el cromatograma obtenido de la inyección de un extracto de tejido adiposo subcutáneo que previamente fue adicionado con amiodarona y desetilamiodarona para ajustar una concentración de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ por la adición del 5% del peso final.

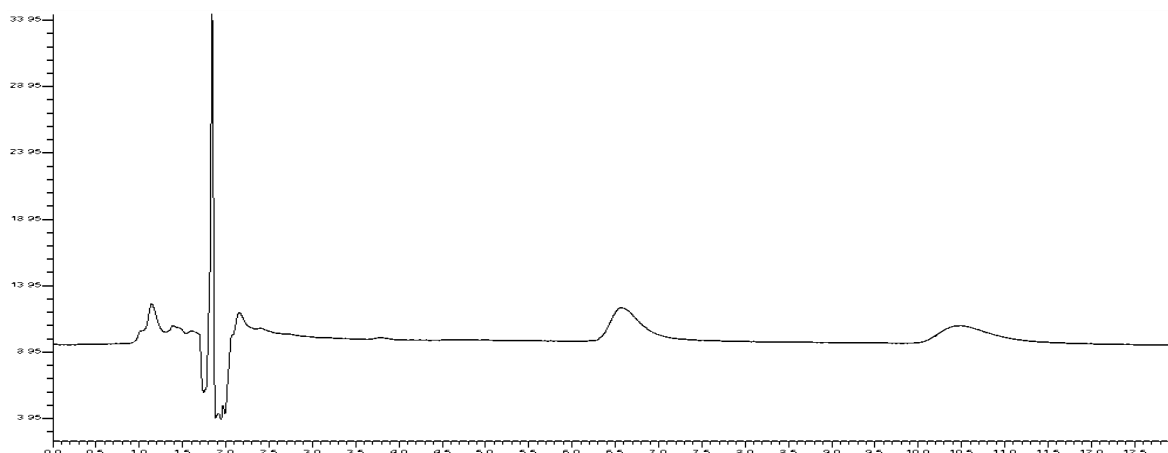


Figura 9 Cromatograma del extracto de DEA y AMD $1 \mu\text{g g}^{-1}$ en tejido adiposo subcutáneo precipitando proteínas con acetonitrilo

De las tres metodologías ensayadas en la búsqueda del mejor resultado de extracción de los analitos en las diferentes matrices estudiadas, los resultados del procedimiento utilizando acetonitrilo 4:1 no fueron los esperados, ya que en la inyección al cromatógrafo, la señal analítica no era suficientemente significativa para lograr el integrado del área del pico cromatográfico formado por la respuesta analítica del detector UV-Vis, probablemente fue debido a que el analito en la muestra era de baja concentración ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) y al adicionar acetonitrilo en esa proporción fue diluido 4 veces, lo que no permitió registrar una señal analítica por el detector, del mismo modo fue inyectada la reconstitución de la extracción por adición de buffer y el resultado en el cromatograma fue significativo, sin embargo

al comparar las áreas del cromatograma por este método contra la precipitación de proteínas con acetonitrilo y extracción con hexano, quedó en desventaja ya que la precipitación de proteínas con acetonitrilo libera los analitos dejándolos disponibles para posteriormente migrar a una fase orgánica de alta afinidad a moléculas no polares, como lo es el hexano para este ensayo. Otros autores emplearon diferentes métodos de extracción como SPE, lo que requiere el empleo de cartuchos especiales y costosos, además de una laboriosa metodología de manipulación de la muestra que no fue posible seguir en este estudio.⁴⁸ Una extracción LLE requiere de una metodología de mayor facilidad y puede ser aplicada incluso con pequeños volúmenes de muestra, en este estudio se utilizaron 600 μL como volumen mínimo de plasma y lisado eritrocitario mientras que la cantidad de tejido adiposo subcutáneo fue de 0.5 g, algunos autores han trabajado con 150 μL como volumen de muestra lo cual lo hace un método de cuantificación más eficiente disminuyendo costos y empleo de reactivos, además utilizaron columnas cromatográficas de un estrecho diámetro de poro de 3 μm , por lo cual emplean equipos cromatográficos que pueden soportar mayores presiones de la fase móvil.³⁶ Por otro lado, en este estudio no se dispuso de un equipo acoplado a un detector de masas y columnas de alta presión, sin embargo fueron logradas adecuadas respuestas con un detector UV-Vis al encontrar buenas condiciones de trabajo y una eficiente extracción LLE, reduciendo el tiempo de manipulación de la muestra y pérdidas por manejo y empleo de dispositivos costosos de trabajo.

Valencia y colaboradores, extrajeron amiodarona mediante la adición de dos partes de acetonitrilo, con la ventaja de obtener recuperaciones altas y reproducibles de los analitos en matrices complejas como lo es el plasma en este ensayo, ya que al emplear acetonitrilo no existen pérdidas de analito a diferencia de hacer una extracción SPE.⁴⁶ Maes y colaboradores, utilizaron una eficiente metodología de extracción en la que emplearon un volumen de 1000 μL de matriz, adicionando metanol y ácido acético glacial como agentes precipitantes de proteínas y a diferencia de este estudio, los autores utilizaron cartuchos de extracción SPE, los cuales requieren de una previa metodología de acondicionamiento, tratamiento y elución. El recuperado obtenido de estos cartuchos fue evaporado y reconstituido en metanol-ácido para posteriormente inyectar 100 μL al equipo cromatográfico, lo que implica mayores tiempos de pretratamiento, a pesar de obtener buenos resultados en los parámetros del método de cuantificación, como un LIC de la Curva de Calibración de 50 ng mL^{-1} y el uso de un equipo LC-MS/MS, 1000 μL como volumen empleado de matriz fue muy grande, lo cual no es conveniente.³⁴

Kogure y colaboradores reportaron una novedosa metodología para cuantificar amiodarona y desetilamiodarona a partir de manchas secas de sangre por LC-MS/MS con un LIC de la Curva de Calibración de 0.2 ng mL^{-1} , lo que indica que los analitos de interés pudieran ser cuantificados a partir de otro tipo muestras en aplicaciones farmacocinéticas, sin embargo en este estudio la precisión y la robustez no fue evaluada, por lo que este método no podría ser aplicado en determinaciones de muestras de pacientes con validación oficial por la agencia

reguladora COFEPRIS en México.⁴⁹ Estos resultados a pesar de contar con un nivel bajo de LIC de la Curva de Calibración no tienen la validez para ser aplicados en muestras de pacientes, ya que no cuentan en su totalidad con los parámetros de las validaciones bioanalíticas para la determinación de fármacos en muestras biológicas, por el contrario en este estudio a pesar de no contar con detectores sensibles y utilizar fluidos biológicos fue logrado cumplir con todos los requerimientos, por lo cual el método es completo y potencialmente aplicable en muestras de pacientes.

Rodrigues y colaboradores, utilizaron una metodología de MEPS (*Micro Extraction by Packet Sorbent*), con un pretratamiento de precipitación 4:1 acetonitrilo:plasma, con el uso de un sorbente de característica no polar empacado en un cartucho que retiene a los analitos por la lipofilicidad de los mismos, para finalmente eluirlos y recuperarlos e inyectarse al cromatógrafo. Las ventajas reportadas por estos autores son el empleo de un volumen de matriz de 100 μL y un LIC de la Curva de Calibración de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo cual hace este método conveniente para la aplicación farmacocinética.³⁷ El método propuesto en este estudio cumple las especificaciones de validación bioanalítica en México y la mayoría de las internacionales, sin la necesidad del uso de MEPS, aunque en este procedimiento un volumen mayor de muestra fue empleado, un similar LIC de la Curva de Calibración de $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$, lo que significa que con las dos diferentes metodologías de extracción SPE y LLE, que se pueden lograr parámetros de validación parecidos, teniendo como ventaja que la extracción realizada en este proyecto: LLE otorga un ahorro de procedimiento de

manipulación de la muestra y pérdida de la misma, a pesar de no emplear cromatógrafos de altas presiones.

Lafuente y colaboradores, validaron un método bioanalítico para la determinación de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo, como procedimiento previo a la extracción de los analitos en la matriz, los autores hicieron una digestión con lipasa por 16 horas a 50°C, para realizar una extracción LLE utilizando éter dietílico como agente extrayente.²⁵ En este proyecto se realizó una extracción LLE al igual que los anteriores autores, sin embargo, a diferencia de ellos el agente extrayente fue hexano en lugar de acetonitrilo, ya que este último permite la liberación de los analitos de los componentes de la matriz, además de que al enfriar la mezcla permite separar los componentes sólidos. Sigue en cuestión el porcentaje de recobro entre ambos métodos comparados, aunque al evaluar la precisión de ambos métodos resultan tener valores aceptables.

Rodrigues y colaboradores, validaron un método bioanalítico para la determinación de amiodarona en diferentes tejidos de origen animal,³⁶ al igual que en este proyecto la metodología de extracción de los autores consistió en el mismo procedimiento, una precipitación de proteínas por adición de acetonitrilo y una posterior extracción con hexano. Este procedimiento brinda la ventaja de no tener pérdidas de analito, mínimos pasos de proceso y utilización de pocos reactivos o material empleado.

8.3 Validación del método analítico para la cuantificación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

8.3.1 Selectividad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Para confirmar que el método es selectivo a amiodarona y desetilamiodarona una alícuota de plasma, otra de lisado eritrocitario y una de tejido adiposo subcutáneo libres de fármaco fueron procesadas por la metodología de precipitación de proteínas con acetonitrilo para posteriormente realizar la extracción con hexano e inyectar al cromatógrafo con las condiciones antes mencionadas. La figura 10 corresponde al cromatograma que muestra la ausencia de señal para los tiempos de retención de los analitos de interés en plasma libre de fármaco.

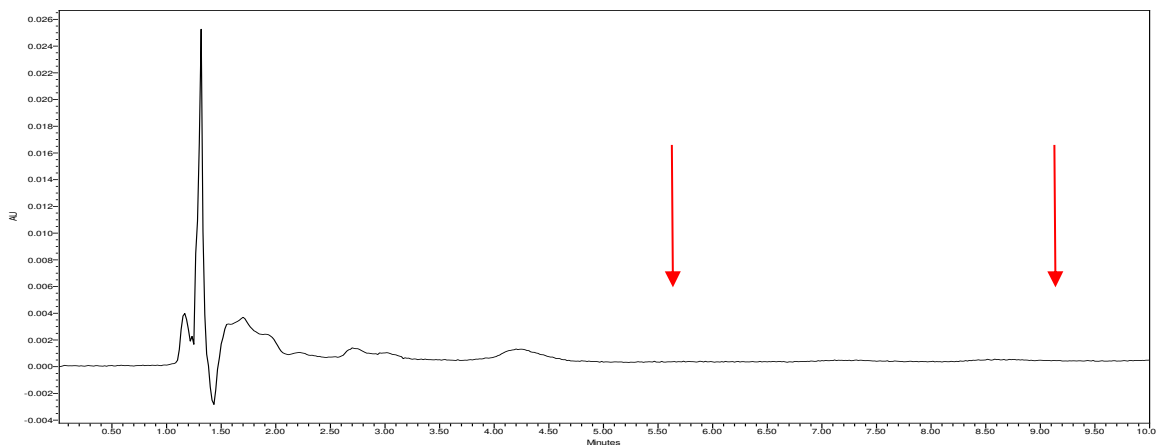


Figura 10 Cromatograma del extracto de plasma libre de fármaco

La figura 11 corresponde al cromatograma que muestra la ausencia de señal para los tiempos de retención de los analitos de interés en lisado eritrocitario libre de fármaco.

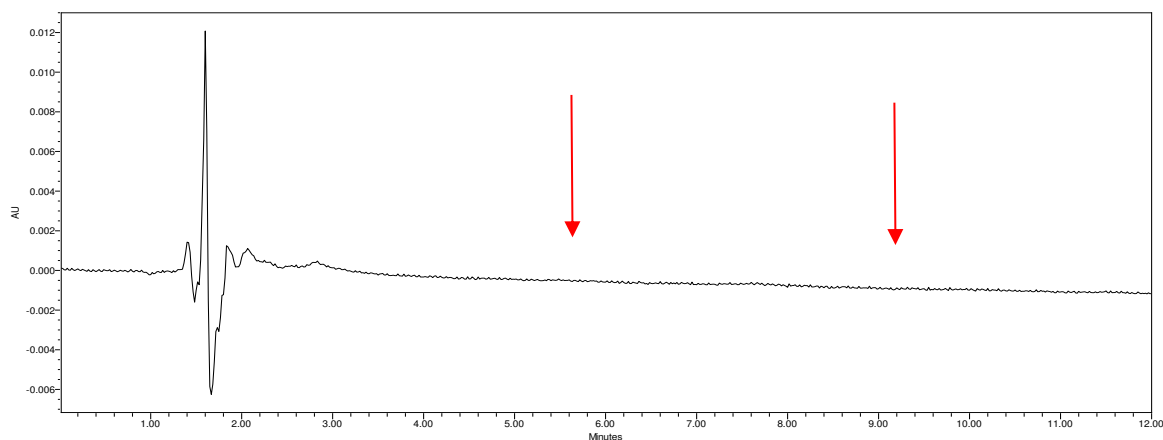


Figura 11 Cromatograma del extracto del lisado eritrocitario libre de fármaco

La figura 12 corresponde al cromatograma que muestra la ausencia de señal para los tiempos de retención de los analitos de interés en tejido adiposo subcutáneo libre de fármaco.

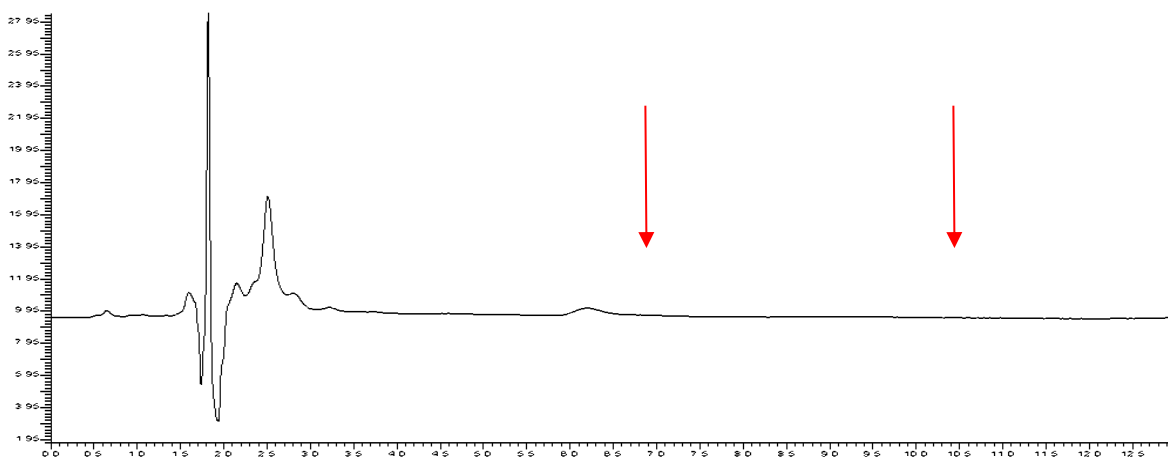


Figura 12 Cromatograma del extracto de tejido adiposo subcutáneo libre de fármaco

En los anteriores cromatogramas se demuestra la no interferencia de los compuestos endógenos en los concentrados de plasma, lisado eritrocitario y

tejido adiposo subcutáneo. Rodrigues y colaboradores compararon los diferentes tiempos de retención de otros fármacos que potencialmente son prescritos en conjunto con amiodarona, reportaron los tiempos de retención obtenidos en las condiciones que fueron fijadas, los cuales son menores comparados con los de amiodarona y la desetilamiodarona, lo que indica que hay muy poca interacción con las fases estacionarias.³⁷ Considerando los resultados de los tiempos de retención de los fármacos que reportan los anteriores autores, la amiodarona y la desetilamiodarona son analitos con pocas probabilidades de presentar interferencias en relación a su t_R y longitud de onda.

Lafuente y colaboradores, cuantificaron amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo de diferentes pacientes en tratamiento con amlodipino, pravastatina, simvastatina o atorvastatina y demostrando que el método fue selectivo para los analitos de interés, y que el tratamiento concomitante de los pacientes no afectó al momento de hacer las determinaciones en las matrices.²⁵ En el presente proyecto, los cromatogramas de los extractos de tejido adiposo subcutáneo no mostraron interferencias en los tiempos de retención de los analitos, por lo cual se demuestra que el método bioanalítico es selectivo para amiodarona y desetilamiodarona en la matriz empleada.

8.3.2 Límite Inferior de Cuantificación de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

El LIC de la Curva de Calibración fue de $0.125 \mu\text{g mL}^{-1}$ en plasma y lisado eritrocitario, tanto para la amiodarona como para la desetilamiodarona, mientras un LIC de la Curva de Calibración de $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue considerado en tejido adiposo subcutáneo debido a que la Norma Oficial Mexicana consultada permite ajustar este valor de acuerdo a los objetivos de los investigadores y a las concentraciones esperadas además que amiodarona es considerado un fármaco de alta variabilidad farmacocinética. Fue obtenida una respuesta adecuada por el detector UV-Vis del equipo cromatográfico, por lo que se pudieron utilizar estos valores como LIC de la Curva de Calibración de las matrices empleadas. Otros autores emplearon un LIC de la Curva de Calibración menor al propuesto en este estudio, aún cuando las normas de validaciones bioanalíticas no requieren que sean menores del 5% del $C_{\text{máx}}$. Yoshifumi y colaboradores usaron un cromatógrafo LC-MS/MS y determinaron el pico cromatográfico de una concentración de tan solo 0.1 pg mL^{-1} , sin embargo estos autores no determinaron la precisión del sistema, ni la robustez por lo que el método no fue validado completamente a los requerimientos de una agencia reguladora para la determinación de fármacos en sangre.⁴⁹ Shayeganpour y colaboradores reportaron un LIC de la Curva de Calibración de 2.5 ng mL^{-1} cuantificando amiodarona y su principal metabolito por LC-MS/MS, los autores hicieron una comparación de los diferentes LIC de la Curva de Calibración en matrices de

origen animal y humano, encontrando que para analizadores másicos el orden de las unidades encontradas es en nanogramos.⁵⁰ La concentración del LIC de la Curva de Calibración en este proyecto coincide con el reportado por Rodrigues y colaboradores, con la diferencia de que los autores trabajaron con una concentración de 0.1 mg mL^{-1} y en este proyecto 0.125 mg mL^{-1} para amiodarona y desetilamiodarona. Estos valores son útiles para las concentraciones esperadas en la determinación del antiarrítmico y su metabolito en muestras de plasma y lisados eritrocitarios.³⁷

Lafuente y colaboradores reportaron que la concentración del LIC de la Curva de Calibración del método bioanalítico empleado fue de $1.0 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ para amiodarona y desetilamiodarona en tejido graso subcutáneo,²⁵ este valor coincide para el método desarrollado para el presente estudio, los autores antes mencionados utilizaron LC-MS/MS como técnica bioanalítica, lo que indica que los resultados obtenidos por este método son trazables con un método de cuantificación de mayor sensibilidad, ya que el empleado para este proyecto fue LC-UV-Vis.

Rodrigues y colaboradores reportaron un LIC de la Curva de Calibración en diferentes tejidos de origen animal de $0.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en LC-UV-Vis,³⁶ en el presente proyecto el LIC de la Curva de Calibración fue de $1.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, debido a que las concentraciones esperadas en pacientes son por arriba de este valor, aunque los anteriores autores reportaron un LIC de la Curva de Calibración de menor concentración, lo cual indica que el método podría adaptarse para este parámetro

a una menor concentración en caso de ser necesario y que podrían obtenerse buenos resultados de precisión.

8.3.3 Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Las concentraciones de los puntos de la Curva de Calibración se establecieron con las concentraciones esperadas, las cuales son 0.125, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la amiodarona y la desetilamiodarona en plasma y lisado eritrocitario mientras que se emplearon 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 30.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo.

En la tabla 7 se muestran las ecuaciones y Coeficientes de determinación obtenidas de los datos de la Curva de Calibración para amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo, obtenidas mediante la caracterización de un método matemático para relacionar la concentración y el área de los cromatogramas.

Tabla 7 Ecuaciones de la Curva de Calibración y Coeficientes de determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Analito	Ecuación de Curva de Calibración	Coeficiente de determinación r^2
plasma		
Amiodarona	$Y=245900x-25290$	0.9964
Desetilamiodarona	$Y=232800x+108600$	0.9890
lisado eritrocitario		
Amiodarona	$Y=161200x+3180$	0.9852
Desetilamiodarona	$Y=69540x+14960$	0.9897
tejido adiposo subcutáneo		
Amiodarona	$Y=15060x+16320$	0.9805
Desetilamiodarona	$Y=10940x+17600$	0.9649

Los Coeficiente de determinación de la amiodarona y la desetilamiodarona en las matrices evaluadas fueron aproximados a 1, lo que demuestra que los resultados correspondientes a las ordenadas se aproximan en un 99% en plasma y lisado eritrocitario y un 96% en tejido adiposo subcutáneo a un modelo matemático lineal reflejando una porción mínima no significativa de error, por lo que es posible aplicar los datos de estas Curva de Calibración en la determinación de los analitos en estas matrices biológicas.

En la tabla 8 se encuentran las concentraciones nominales de los puntos de la Curva de Calibración en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo, el porcentaje de coeficiente de variación y el resultado según los criterios de aceptación de la Normatividad consultada.

Tabla 8 CV% de los puntos de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Estándar	Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	% recuperación AMD	% recuperación DEA	Criterio de aceptación %	Resultado
plasma					
1	0.125	117.15	102.91	80-120	Aceptado
2	0.5	88.52	90.25	85-115	Aceptado
3	1.0	87.15	100.85	85-115	Aceptado
4	2.5	110.46	112.45	85-115	Aceptado
5	5.0	95.21	102.19	85-115	Aceptado
6	10.0	104.38	106.86	85-115	Aceptado
7	15.0	99.74	107.96	85-115	Aceptado
8	20.0	104.44	93.62	85-115	Aceptado
lisado eritrocitario					
1	0.125	83.67	106.95	80-120	Aceptado
2	0.5	97.50	95.04	85-115	Aceptado
3	1.0	99.53	87.81	85-115	Aceptado
4	2.5	111.80	102.96	85-115	Aceptado
5	5.0	101.46	99.48	85-115	Aceptado
6	10.0	93.28	99.58	85-115	Aceptado
7	15.0	100.44	99.07	85-115	Aceptado
8	20.0	101.13	99.02	85-115	Aceptado
tejido adiposo subcutáneo					
1	1.0	99.80	101.80	80-120	Aceptado
2	2.5	104.85	86.48	85-115	Aceptado
3	5.0	100.15	133.22	85-115	Rechazado
4	10.0	108.81	99.66	85-115	Aceptado
5	15.0	99.77	102.32	85-115	Aceptado
6	20.0	98.31	90.08	85-115	Aceptado
7	30.0	100.92	103.02	85-115	Aceptado

Los ocho puntos de la curva de calibración de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma y lisado eritrocitario quedaron dentro de los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, además todos los porcentajes de recuperación, entraron dentro del 85-115% de valor de porcentaje de recuperación y los valores del LIC de la Curva de Calibración dentro del 80-120% como lo especifica la norma.

Los siete puntos de la curva de calibración de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo fueron evaluados sin embargo solamente seis entraron en los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, respecto al porcentaje de recuperación y el LIC de la Curva de Calibración dentro del 80-120% como lo especifica la norma. En la Norma Oficial Mexicana se especifica que un mínimo de seis puntos deben ser caracterizados y que un mínimo del 75% de los mismos deben cumplir con el criterio de aceptación, por lo tanto la Curva de Calibración es aceptada para la determinación de los analitos en tejido adiposo subcutáneo.

En la figura 13 se muestra la gráfica representativa de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, en función de las respuestas obtenidas por la inyección de 45 μL del precipitado recuperado y disuelto en metanol, un total de 8 puntos de diferentes concentraciones de ambos analitos fueron evaluados entre 0.125 y 20.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



En la figura 14 se muestra la gráfica representativa de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en lisado eritrocitario, en función de las respuestas obtenidas por la inyección de 45 µL del precipitado recuperado y disuelto en metanol, un total de 8 puntos diferentes de concentración de ambos analitos fueron evaluados entre 0.125 y 20.0 µg mL⁻¹.

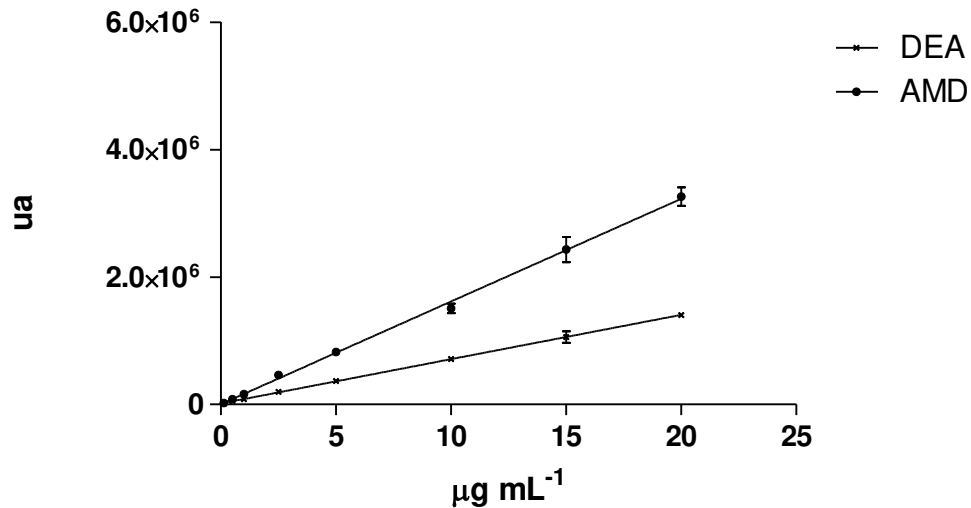


Figura 14 Curva de Calibración de AMD y DEA en lisado eritrocitario

La Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en lisado eritrocitario fue continua y reproducible en el intervalo de trabajo. Las soluciones patrón que conformaron la Curva de Calibración fueron leídas por triplicado. Seis puntos de la Curva de Calibración quedaron dentro del criterio de mínimo 75% de las concentraciones con un mínimo CV% de 15%. La linealidad del sistema fue evaluada por el r^2 , el cual para ambos analitos fue lineal en el intervalo de trabajo ($0.125\text{--}20.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) y permite cubrir las concentraciones esperadas en los pacientes.

En la figura 15 se muestra la gráfica representativa de la Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo, en función de las respuestas obtenidas por la inyección de $20\text{ }\mu\text{L}$ del precipitado recuperado y disuelto en metanol, un total de 6 puntos diferentes de concentración de ambos analitos fueron evaluados entre 0.125 y $20.0\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$.

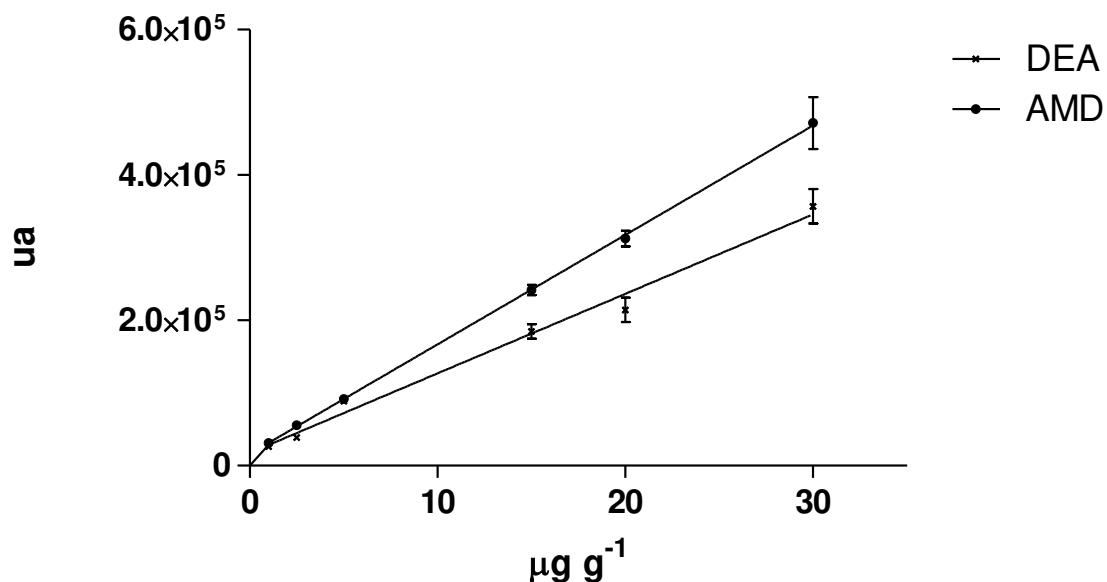


Figura 15 Curva de Calibración de AMD y DEA en tejido adiposo subcutáneo

La Curva de Calibración de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo fue continua y reproducible en el intervalo de trabajo, las soluciones patrón que la conformaron fueron leídas por triplicado. Seis puntos de la Curva de Calibración quedaron dentro del criterio de mínimo 75% de las concentraciones con un mínimo CV% de 15%. La linealidad del sistema fue evaluada por el r^2 , el cual para ambos analitos fue lineal en el intervalo de trabajo ($1.0\text{-}30.0 \mu\text{g g}^{-1}$) y permite cubrir las concentraciones esperadas en los pacientes.

El intervalo de trabajo fue de 0.125 a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para amiodarona y desetilamiodarona en plasma y lisado eritrocitario y de $1.0\text{-}30.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ en tejido adiposo subcutáneo, los cuales fueron fijados a las concentraciones esperadas, Kogure y colaboradores reportaron un intervalo de 0.0015 a 1500 ng mL^{-1} , en

manchas secas de sangre el cual puede ser aplicado a muestras de difícil obtención o menores volúmenes, sin embargo ese intervalo de trabajo no es adecuado para muestras de plasma, ya que las concentraciones esperadas en muestras de pacientes durante la terapia con amiodarona, considerando las dosis comúnmente usadas y los parámetros farmacocinéticos del fármaco.⁴⁹ El intervalo de trabajo fue reportado por Kuhn y colaboradores fue de 0.02 a 40.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con aplicación en muestras obtenidas de pacientes, el cual sí podría ser ocupado para las concentraciones esperadas de pacientes en tratamiento con amiodarona,³⁵ el intervalo de trabajo propuesto por nuestra validación bioanalítica es similar al último estudio mencionado, el cual fue validado con Cromatografía Líquida acoplada a un detector de masas, lo que indica que es posible obtener resultados trazables de un detector UV-Vis y con uno de mayor sensibilidad como el MS/MS.

Rodrigues y colaboradores, en el estudio de determinación de la amiodarona y desetilamiodarona en diferentes tejidos de rata, reportaron un intervalo de trabajo de 0.1 a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esta validación podría ser útil en la determinación de las moléculas en muestras de pacientes.³⁶ Estos autores, al igual que lo empleado en el presente estudio, utilizaron LLE como técnica de extracción, un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector UV-Vis, así mismo encontraron resultados similares, reflejando que a pesar de variar los agentes extrayentes y la composición de fase móvil los resultados son trazables.

Heger y colaboradores reportaron que la desetilamiodarona tiene una mayor afinidad por los eritrocitos,⁴¹ lo cual coincide con los resultados de la Curva de Calibración del metabolito en lisado eritrocitario obtenidos en el presente estudio. Por otro lado Maling y colaboradores también publicaron resultados similares, tras la cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona resultó ser mayor la concentración del metabolito en eritrocitos que la del fármaco.⁴² Estas publicaciones coinciden con los resultados encontrados en el presente estudio ya que en la recta de desetilamiodarona (figura 14) tiene una pendiente con menor valor que la de amiodarona, indicando que el analito muestra una mayor afinidad a los componentes del lisado eritrocitario con una menor disponibilidad de migrar al agente extrayente en la metodología de extracción, por lo que la Curva de Calibración de desetilamiodarona en lisado eritrocitario aparece ligeramente abajo respecto a la recta de amiodarona, sin embargo el intervalo de trabajo mantuvo la linealidad y precisión para ambos analitos, por lo que esta Curva de Calibración es útil para los objetivos de la validación bioanalítica.

Lafuente y colaboradores cuantificaron ambos analitos en tejido adiposo subcutáneo reportando un intervalo de trabajo de 1.0-100.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, debido a que las concentraciones de amiodarona en tejido adiposo subcutáneo de pacientes estuvieron en un rango de 4.0-226.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, por lo que diluciones fueron aplicadas en las muestras para que éstas quedaran dentro del intervalo de trabajo reportado por el método.²⁵ El intervalo de trabajo reportado en este estudio para ambos analitos en tejido adiposo subcutáneo fue de 1.0-30.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ aún cuando es de menor intervalo de concentraciones (1.0-20.00 $\mu\text{g g}^{-1}$), las muestras de

tejido adiposo subcutáneo provenientes de pacientes en terapia, pueden ser diluidas adecuadamente para su cuantificación precisa y exacta en caso de ser necesario. Rodrigues y colaboradores cuantificaron amiodarona y su metabolito en tejidos de animales con intervalo de trabajo de 0.1-15.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sin embargo, los autores consideraron evaluar el factor de dilución 1:4 por adición de matriz libre de fármaco para cuantificar las muestras con una concentración mayor al Límite Superior de la Curva de Calibración.³⁶

8.3.4 Precisión de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

La concordancia entre los resultados analíticos individuales en el procedimiento fue evaluada por repetibilidad y reproducibilidad. En este estudio se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad como lo indica la normatividad consultada,³⁹ con el fin de utilizar esta validación bioanalítica en la determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo de pacientes en tratamiento crónico con amiodarona. Algunos autores como Montes y colaboradores, a pesar de contar con equipos de alta sensibilidad, reportan un LIC de la Curva de Calibración de 0.10 ng g^{-1} , sin embargo no consideran conveniente evaluar la precisión de su método, ya que solo evaluaron repetibilidad dejando la reproducibilidad pendiente, de haber sido completado el ensayo, la validación bioanalítica podría haber tenido aplicaciones en las determinaciones de las moléculas en cuestión.⁵¹

El LIC de la Curva de Calibración del presente estudio difiere de los autores anteriores, sin embargo el intervalo de trabajo del presente estudio fue el adecuado para que cualquier concentración esperada de un paciente en terapia crónica con amiodarona pueda ser determinada con el método bioanalítico, los parámetros de la validación cumplieron con la Norma Oficial consultada,³⁹ por lo cual los resultados indican que el método es preciso con la potencial aplicación en determinaciones del fármaco en mención a pacientes en tratamiento.

8.3.4.1 Repetibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Para determinar la repetibilidad de la técnica se analizó en un mismo día por quintuplicado las muestras control: LIC de la Curva de Calibración, MCB, MCM y MCA de cada matriz, calculando la concentración obtenida para cada nivel y graficando su respuesta analítica en la curva de calibración.

En la tabla 9 están reportados los resultados obtenidos del ensayo de repetibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

Tabla 9 CV% del ensayo de Repetibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario, tejido adiposo subcutáneo

Repetibilidad	LIC	MCB	MCM	MCA
plasma				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.15 ± 0.002	1.51 ± 0.008	8.24 ± 0.580	18.21 ± 0.908
CV% AMD	1.07	0.52	7.04	4.98
Concentración observada DEA $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.13 ± 0.001	1.30 ± 0.014	8.42 ± 0.446	18.44 ± 0.894
CV% DEA	0.93	1.06	5.30	4.85
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
lisado eritrocitario				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.10 ± 0.004	1.50 ± 0.204	7.24 ± 0.444	15.86 ± 0.194
CV% AMD	3.48	13.61	6.13	1.22
Concentración observada DEA $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.14 ± 0.007	1.55 ± 0.128	7.71 ± 0.599	20.21 ± 0.297
CV% DEA	5.37	8.27	7.77	1.47
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
tejido adiposo subcutáneo				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.95 ± 0.097	1.48 ± 0.180	7.4 ± 0.477	17.72 ± 1.908
CV% AMD	10.18	12.16	6.40	10.76
Concentración observada DEA $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.02 ± 0.158	1.57 ± 0.115	9.17 ± 0.952	20.36 ± 2.038
CV% DEA	15.50	7.31	10.38	10.01
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado

En la figura 16 se encuentran los gráficos de barras representativos de 5 réplicas de los controles correspondientes al ensayo de repetibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma.

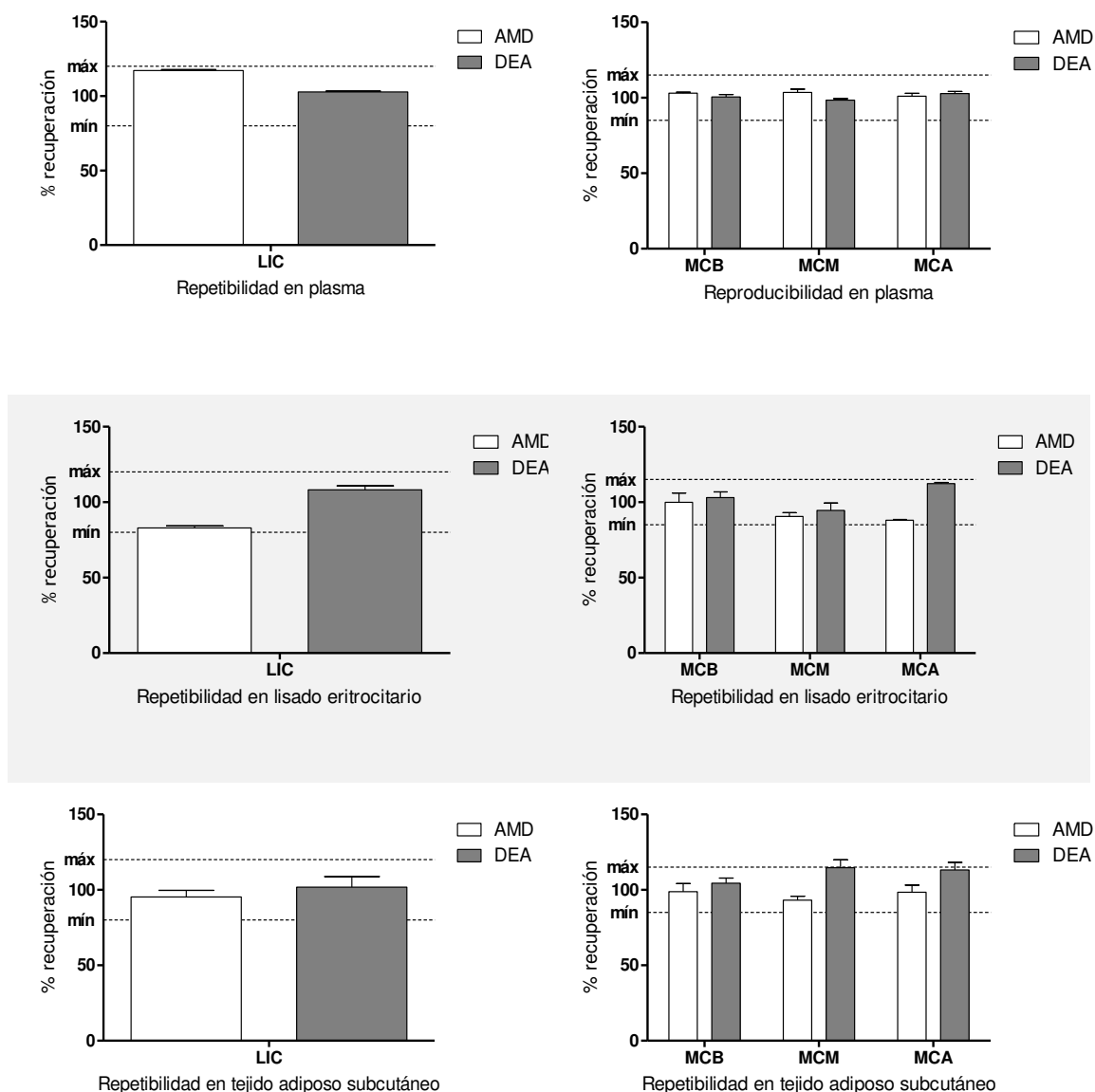


Figura 16 Representación de los porcentajes de recuperación de cinco réplicas de cada muestra control para amiodarona y desetilamiodarona. LIC de la Curva de Calibración (lado izquierdo), MCB, MCM y MCA (lado derecho) en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo. Las líneas discontinuas muestran el mínimo y el máximo porcentaje de Recuperación en el ensayo de repetibilidad indicado por la NOM-177-SSA1-2013 siendo 80-120 % para el LIC y 85-115 % para MCB MCM y MCA

Los cuatro controles correspondientes al ensayo de repetibilidad en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo se encontraron dentro de los

parámetros especificados por la Norma Oficial consultada, al evaluar diferentes porciones de la Curva de Calibración con muestras que no forman parte de los puntos de la curva, fue determinado que los métodos son precisos al someterlos a la evaluación de réplicas idénticas en el mismo momento del análisis para amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

La repetibilidad en otros ensayos también ha sido evaluada como precisión intra-diaria, Rodrigues y colaboradores evaluaron tres muestras control de baja, media y alta concentración por quintuplicado de acuerdo a la Agencia Reguladora de Medicamentos de Europa, el criterio de aceptación para la precisión fue evaluada por CV%, el cual fue menor del 15% para todas las muestras control en tejidos de origen animal.³⁶ La precisión intra-diaria, equivalente a la repetibilidad según lo que especifica la Norma Oficial Mexicana consultada, fue reportada por Rodrigues y colaboradores en un estudio similar, para la cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona de cuatro controles al igual que en el presente estudio, reportan en términos de CV% con los valores de los controles menores al 7%, los autores hicieron la validación según los criterios de la EMA,³⁷ los CV% de los controles del presente estudio fueron de acuerdo a los establecidos por la normatividad vigente en México y a haber sido los valores menores al 15%, también entran en el rango de aceptación de los criterios emitidos por la Agencia Reguladora de Medicamentos en Europa.³⁸

8.3.4.2 Reproducibilidad del método bioanalítico de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Para determinar la reproducibilidad del método analítico se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos dos días, las muestras control: LIC de la Curva de Calibración, MCB, MCM y MCA. También para cada MC, se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la Curva de Calibración. El valor promedio del CV% no fue mayor al 15%, excepto para el LIC de la Curva de Calibración, el cual fue menor que el 20%.

En la tabla 10 están reportados los resultados obtenidos del ensayo de Reproducibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

Tabla 10 CV% del ensayo de Reproducibilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Reproducibilidad	LIC	MCB	MCM	MCA
plasma				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.14 ± 0.002	1.55 ± 0.023	8.29 ± 0.374	18.18 ± 0.758
CV% AMD	1.46	1.51	4.51	4.17
Concentración observada DEA $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.14 ± 0.003	1.51 ± 0.052	7.88 ± 0.183	18.51 ± 0.524
CV% DEA	2.23	3.45	2.32	2.83
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
lisado eritrocitario				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.11 ± 0.005	1.50 ± 0.122	7.63 ± 0.957	15.74 ± 0.613
CV% AMD	4.24	8.10	12.55	3.89
Concentración observada DEA $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.14 ± 0.007	1.66 ± 0.076	7.74 ± 0.657	20.06 ± 0.312
CV% DEA	5.37	4.59	8.49	1.55
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
tejido adiposo subcutáneo				
Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.0	1.5	8.0	18.0
Concentración observada AMD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.03 ± 0.088	1.61 ± 0.077	7.94 ± 0.636	17.44 ± 0.419
CV% AMD	8.51	4.77	8.02	2.40
Concentración observada DEA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1.01 ± 0.163	1.54 ± 0.096	8.64 ± 1.268	17.85 ± 1.189
CV% DEA	16.09	6.24	14.67	6.66
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado

En la figura 17 se encuentran los gráficos de barras representativos de cinco réplicas de los controles correspondientes al ensayo de Reproducibilidad de

amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

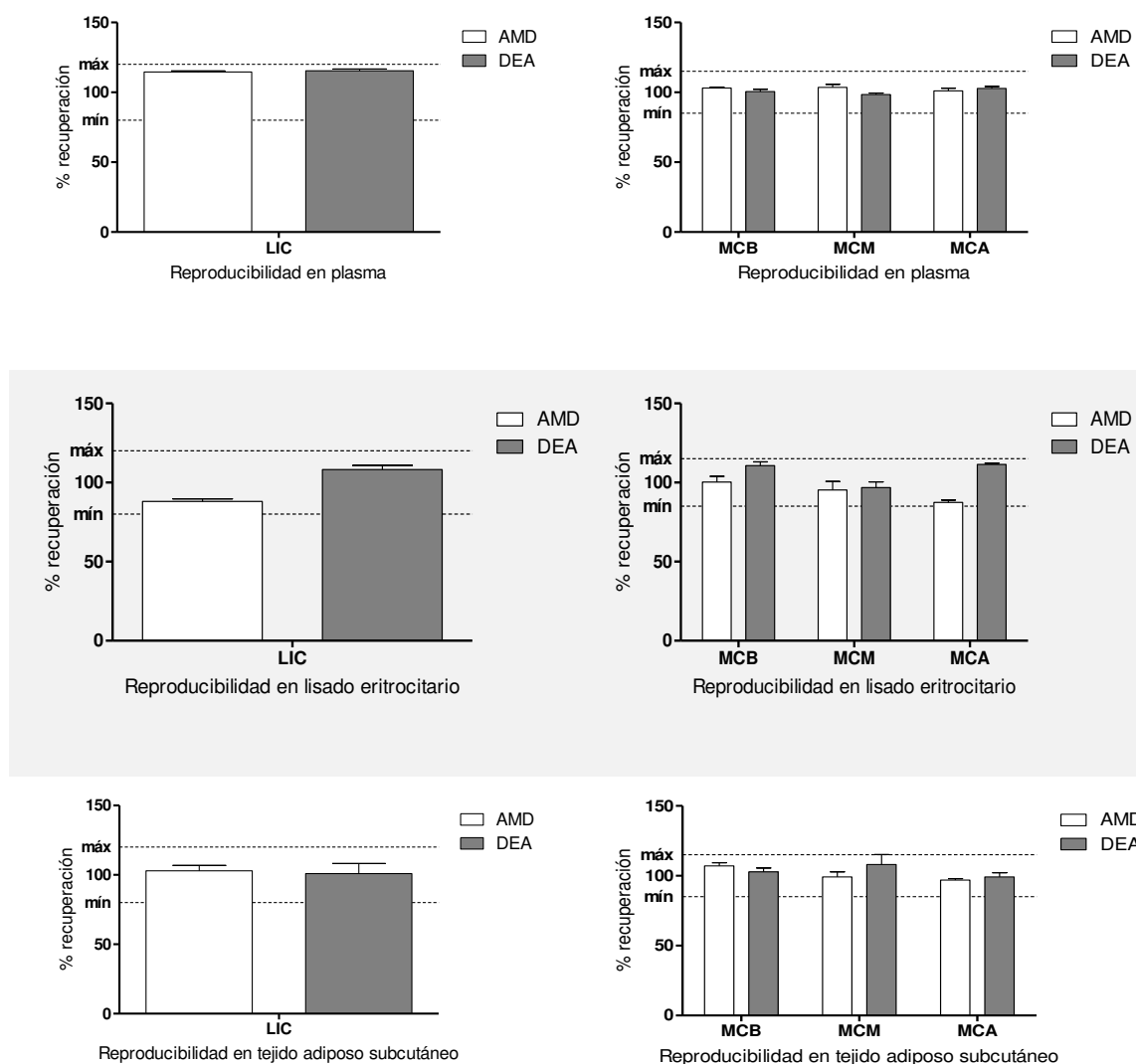


Figura 17 Representación de los porcentajes de recuperación de cinco réplicas de cada muestra control para amiodarona y desetilamiodarona. LIC de la Curva de Calibración (lado izquierdo), MCB, MCM y MCA (lado derecho) en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo. Las líneas discontinua muestran el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación en el ensayo de Reproducibilidad indicado por la NOM-177-SSA1-2013 siendo 80-120 % para el LIC y 85-115 % para MCB MCM y MCA

Las cuatro MC correspondientes al ensayo de Reproducibilidad en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo se encontraron dentro de los parámetros

especificados por la Norma Oficial consultada, al evaluar diferentes porciones de la Curva de Calibración con muestras que no forman parte de los puntos de la curva, el método es preciso al someterlo a la evaluación de réplicas idénticas en diferentes momentos en diferentes corridas analíticas del análisis para amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

Rodrigues y colaboradores evaluaron la reproducibilidad con el nombre de precisión inter-diaria, que en términos de procedimiento es el equivalente a reproducibilidad como lo determina la Norma Oficial Mexicana, los autores reportan cuatro MC evaluadas por quintuplicado con CV% de apenas 5%, por lo que se puede determinar que su metodología es muy precisa en términos de reproducibilidad.³⁷ Otros autores, como Montes y colaboradores no consideraron evaluar la reproducibilidad a pesar de contar con buenos resultados de LIC y un equipo de alta sensibilidad acoplado a un analizador másico.⁵¹ Existen reportes donde utilizan otras matrices, Kogure y colaboradores emplearon gotas secas de sangre como muestra para la determinación de amiodarona y desetilamiodarona, reportando una baja concentración de LIC de 1.0 ng mL^{-1} , sin embargo no evalúan la precisión de su método por lo cual no podría ser aplicado en la determinación de la amiodarona en muestras de pacientes en tratamiento crónico.⁴⁹ En el presente estudio todos los valores de CV% fueron menores al 15% por lo que quedan dentro de los parámetros especificados por la Norma Oficial Mexicana vigente, indicando que este método es preciso en términos de

precisión inter-diaria de los parámetros de Guía de validación de métodos bioanalíticos de la EMA.³⁸

8.3.5 Exactitud del método bioanalítico de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Para evaluar la exactitud, de los datos de Repetibilidad y Reproducibilidad del método en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo fue calculado el porcentaje de desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) de las MC empleando la ecuación:

$$\%desviación = \frac{(Concentración\ adicionada) - (Concentración\ obtenida)}{Concentración\ adicionada} \times 100$$

(C) Ecuación de % de desviación

En la tabla 11 se encuentran los resultados de % de desviación del ensayo de Repetibilidad del método de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

Tabla 11 Promedio de % de desviación de la concentración obtenida de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de Repetibilidad

	LIC	MCB	MCM	MCA
plasma				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	17.23	0.92	2.95	1.19
% Desviación DEA	2.84	13.10	5.25	2.42
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
lisado eritrocitario				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	17.01	0.07	9.45	11.90
% Desviación DEA	8.23	3.05	3.63	12.28
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
tejido adiposo subcutáneo				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	4.64	1.18	6.80	1.54
% Desviación DEA	1.82	4.42	14.65	13.12
Criterio de aceptación %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado

Todos los valores de % de desviación de la concentración obtenida de las MC de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de repetibilidad del método, fueron menores a los permitidos de la Norma Oficial Mexicana,³⁹ además de que quedaron dentro de los criterios de otras Normas como la consultada de la Unión Europea,³⁸ aunque en esta normativa se denomina exactitud dentro de la corrida analítica.

En la tabla 12 se encuentran los resultados de los porcentajes de desviación del ensayo de Reproducibilidad del método de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

Tabla 12 Promedio de porcentaje de desviación de la concentración obtenida de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de Reproducibilidad

	LIC	MCB	MCM	MCA
plasma				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	14.55	3.00	3.60	1.01
% Desviación DEA	15.49	0.60	1.52	2.85
Criterio %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
lisado eritrocitario				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.125	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	17.01	0.07	9.45	11.90
% Desviación DEA	8.23	10.73	3.21	11.44
Criterio %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado
tejido adiposo subcutáneo				
Concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.0	1.5	8.0	18.0
% Desviación AMD	2.93	7.07	0.80	3.11
% Desviación DEA	0.98	2.75	8.05	0.81
Criterio %	≤ 20	≤ 15	≤ 15	≤ 15
Resultado	Aceptado	Aceptado	Aceptado	Aceptado

Todos los valores de % de desviación de la concentración obtenida de las MC de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de reproducibilidad, fueron menores a las especificaciones por la Norma Oficial Mexicana, además de que también se encuentran dentro de los criterios de otras Normas como la consultada de la

Unión Europea,³⁸ sin embargo en esta normativa se denomina exactitud entre corrida analítica.

8.3.6 Estabilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

La capacidad de los analitos de permanecer dentro de las especificaciones de calidad adecuadas, fue determinada por la estabilidad a corto y largo plazo, durante el tiempo de procesamiento de la muestra y en el automuestreador, 3 ciclos de congelación y descongelación en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo.

8.3.6.1 Estabilidad de amiodarona y desetilamiodarona a corto y largo plazo en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

La estabilidad de la amiodarona y la desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo fue evaluada a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra, 22°C y tres horas quedando este como corto plazo, mientras un periodo de tres meses en congelación como largo plazo, el cual es equivalente al tiempo que transcurre desde la recolección de muestras hasta el análisis.

En la tabla 13 se encuentran los resultados en % de recuperación comparados con las concentraciones nominales de las muestras control MCB y MCA en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo del ensayo de estabilidad a corto y largo plazo.

Tabla 13 Porcentaje de recuperación del ensayo de estabilidad a corto y largo plazo de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Muestra Control	% de recuperación corto plazo	% de recuperación largo plazo	Criterio de aceptación %	Resultado
plasma				
MCB AMD	107.95 ± 2.73	88.40 ± 2.81	85-115	Aprobado
MCA AMD	101.37 ± 1.36	89.92 ± 1.51	85-115	Aprobado
MCB DEA	99.54 ± 2.68	85.83 ± 1.61	85-115	Aprobado
MCA DEA	105.16 ± 0.37	92.20 ± 3.05	85-115	Aprobado
lisado eritrocitario				
MCB AMD	95.86 ± 5.65	86.71 ± 6.57	85-115	Aprobado
MCA AMD	108.65 ± 8.58	87.97 ± 2.03	85-115	Aprobado
MCB DEA	104.64 ± 9.56	87.16 ± 1.90	85-115	Aprobado
MCA DEA	109.38 ± 1.10	89.90 ± 4.95	85-115	Aprobado
tejido adiposo subcutáneo				
MCB AMD	103.11 ± 5.42	87.85 ± 4.65	85-115	Aprobado
MCA AMD	100.32 ± 3.01	91.83 ± 10.98	85-115	Aprobado
MCB DEA	102.13 ± 6.48	85.74 ± 3.42	85-115	Aprobado
MCA DEA	102.92 ± 0.94	98.01 ± 4.07	85-115	Aprobado

8.3.6.2 Estabilidad de amiodarona y desetilamiodarona en el automuestreador y ciclos de congelación-descongelación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

La estabilidad de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo fue evaluada tras la metodología de extracción, en

el tiempo y temperatura aproximado del procesamiento de las muestras y durante el análisis en el automuestreador, también fue evaluada la estabilidad de los analitos en las matrices en tres ciclos de congelación-descongelación de 12 horas.

En la tabla 14 se encuentran los resultados en % de recuperación comparados con las concentraciones nominales de las muestras control MCB y MCA en plasma del ensayo de estabilidad en el automuestreador y ciclos de congelación-descongelación.

Tabla 14 Porcentaje de recuperación del ensayo de estabilidad en el automuestreador y ciclos de congelación-descongelación de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma, lisado eritrocitario y tejido adiposo subcutáneo

Muestra Control	% recuperación en el automuestreador	% de recuperación de ciclos de congelación	Criterio de aceptación %	Resultado
plasma				
MCB AMD	95.25 ± 5.56	88.92 ± 4.14	85-115	Aprobado
MCA AMD	97.55 ± 2.40	89.17 ± 3.27	85-115	Aprobado
MCB DEA	97.51 ± 2.59	90.52 ± 2.79	85-115	Aprobado
MCA DEA	101.15 ± 2.52	92.67 ± 3.32	85-115	Aprobado
lisado eritrocitario				
MCB AMD	96.26 ± 1.97	93.75 ± 3.74	85-115	Aprobado
MCA AMD	105.44 ± 4.82	91.64 ± 2.09	85-115	Aprobado
MCB DEA	103.03 ± 5.34	92.07 ± 10.40	85-115	Aprobado
MCA DEA	107.02 ± 5.17	91.36 ± 8.58	85-115	Aprobado
tejido adiposo subcutáneo				
MCB AMD	92.82 ± 9.53	93.87 ± 3.10	85-115	Aprobado
MCA AMD	101.84 ± 7.03	95.85 ± 2.36	85-115	Aprobado
MCB DEA	87.70 ± 3.15	89.19 ± 5.63	85-115	Aceptado
MCA DEA	97.70 ± 3.66	97.45 ± 4.85	85-115	Aprobado

En la figura 18 se encuentran los porcentajes de recuperación de las MC en plasma del ensayo de estabilidad del método, así como los criterios mínimos y

los máximos porcentajes de recuperación especificados por la normatividad consultada

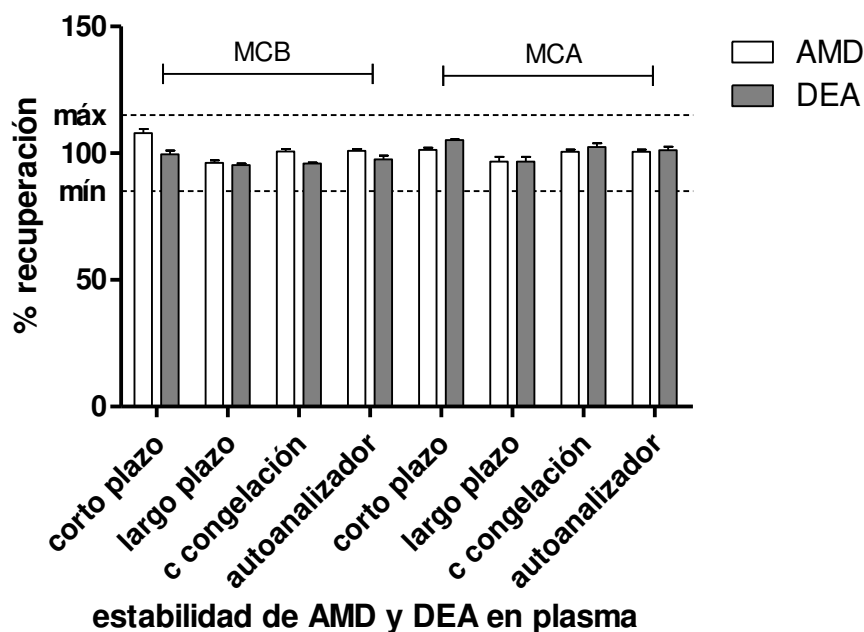


Figura 18 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177-SSA1-2013

Todos los resultados de las MC quedaron en el intervalo de recuperación de 85-115% y un CV% menor al 15% comparados con las concentraciones nominales de las MC evaluadas, cumpliendo con las especificaciones de la Norma Oficial consultada. Los gráficos de barras son representativos del % de recuperación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, después de haber sido sometidos a las condiciones de temperatura y tiempo establecidas: corto y largo plazo, 3 ciclos de congelación-descongelación de 12 horas y 3 horas de los extractos dentro del automuestreador. Este parámetro determinó que las condiciones de temperatura y tiempo fueron las óptimas para amiodarona y la desetilamiodarona en plasma.

Kollroser y colaboradores reportaron un método de validación bioanalítica de amiodarona y desetilamiodarona en plasma humano, obtuvieron un LIC de la curva de Calibración de tan solo $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ para amiodarona y de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para desetilamiodarona al utilizar un detector másico, a pesar de contar con buenos criterios de desempeño de la validación bioanalítica los autores no reportaron los porcentajes de recuperación o los coeficiente de variación de las estabilidades en diferentes condiciones de trabajo,⁴⁸ por lo que el método queda incompleto en la posible determinación de los analitos en muestras con interés clínico. Maes y colaboradores determinaron de manera simultánea amiodarona y metabolito en orina y plasma con un LIC de 50 ng mL^{-1} , el objetivo de su estudio fue desarrollar un método sensible de extracción de analitos en fase sólida, esta pudo haber sido la razón para no considerar evaluar la estabilidad de las moléculas en las matrices empleadas,³⁴ de haber sido probadas el método hubiera cumplido los criterios de validaciones bionalíticas internacionales como la EMA en Europa. Adicionalmente a los estudios con buenos parámetros de validación, aunque sin estabilidades de los analitos en las matrices utilizadas, Kuhn y colaboradores utilizaron detectores másicos y moléculas deuteradas como estándares internos, desarrollaron un método para cuantificar amiodarona y desetilamiodarona en plasma humano, reportaron LIC de $2.7 \mu\text{g L}^{-1}$ para la amiodarona y $1.9 \mu\text{g L}^{-1}$ para la desetilamiodarona, el método de estándar interno permite adicionar precisión, sin embargo al no determinar las estabilidades, esta validación carece de la aprobación de alguna agencia reguladora de medicamentos.

Por otro lado, Rodrigues y colaboradores desarrollaron y validaron un método para la cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona en tejidos de rata con fines de estudios farmacocinéticos, a pesar de no determinar las concentraciones en muestras de pacientes realizaron una validación completa incluyendo parámetros que aportan más información que la solicitada por las diferentes agencias reguladoras, la estabilidad evaluada fue en cortos y largos periodos, además de varias temperaturas, los autores demostraron que los analitos fueron estables en las matrices analizadas, los porcentajes de recuperación fueron muy aproximados al 100%, lo que asegura que todas las condiciones de trabajo mantienen la integridad de los analitos bajo las variables estudiadas.³⁶ Tiempo después los mismos autores, por una extracción en fase sólida, desarrollaron y validaron la determinación de amiodarona y desetilamiodarona en plasma humano, en esta publicación fueron consideradas las especificaciones de la Guía de validación de métodos bioanalíticos de la Unión Europea, por lo que con los ensayos de estabilidad incluidos fueron obtenidos buenos resultados de todas las condiciones estudiadas de corto y largo tiempo en diferentes temperaturas, concluyendo que las moléculas son estables en las diferentes condiciones estudiadas por los autores,³⁷ similares situaciones de tiempo y temperatura fueron ensayados en el presente proyecto, las Muestras Control quedaron dentro de los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana consultada y que así mismo coincide con la Guía de validación de métodos bioanalíticos de la Unión Europea para este criterio de validación.³⁸

En la figura 19 se encuentran los porcentajes de recuperación de las MC en lisado eritrocitario del ensayo de estabilidad del método, así como los criterios mínimos y los máximos porcentajes de recuperación especificados por la normatividad consultada.

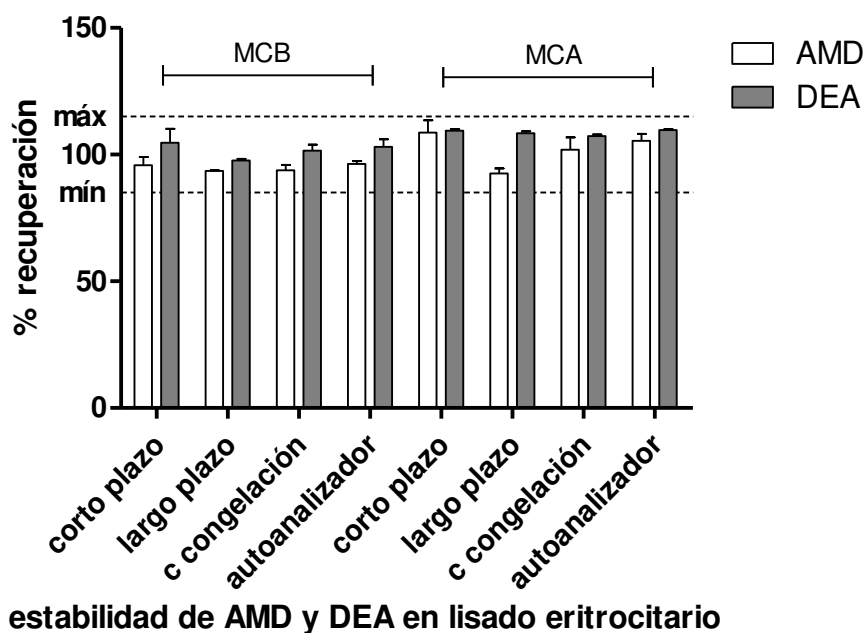


Figura 19 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en lisado eritrocitario en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177-SSA1-2013

En la figura 20 se encuentran los porcentajes de recuperación de las MC en lisado eritrocitario del ensayo de estabilidad del método, así como los criterios mínimos y los máximos porcentajes de recuperación especificados por la normatividad consultada.

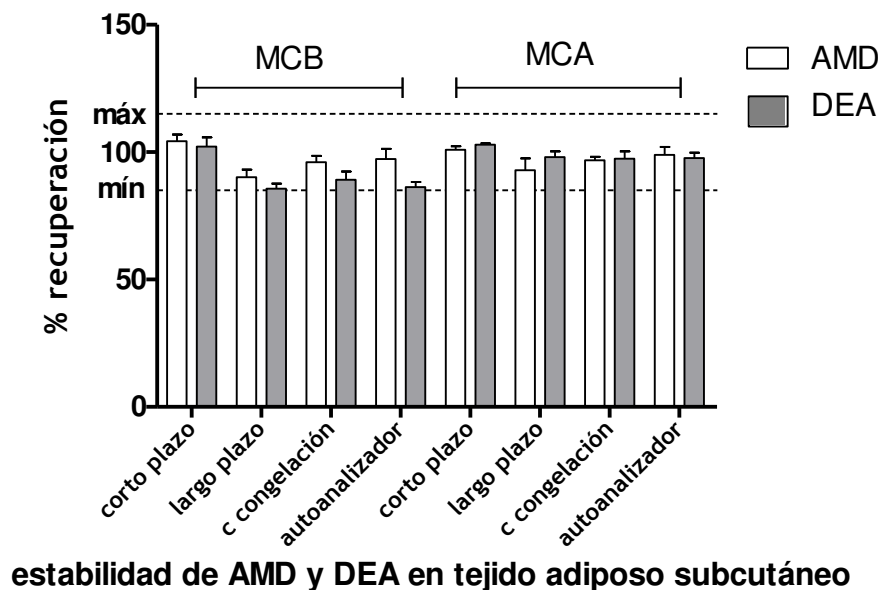


Figura 20 Porcentajes de recuperación representativos de las muestras control MCB y MCA de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo subcutáneo en los ensayos de estabilidad, las líneas discontinuas indican el mínimo y el máximo porcentaje de recuperación especificado según la NOM-177-SSA1-2013

Todos los resultados de las MC fueron encontrados en el intervalo de recuperación de 85-115% y un CV% menor al 15%, comparados con las concentraciones nominales de las MC evaluadas en lisados eritrocitarios, cumpliendo con las especificaciones de la Norma Oficial consultada. Los gráficos de barras son representativos del % de recuperación de amiodarona y desetilamiodarona en lisado eritrocitario, después de haber sido sometidos a las condiciones de temperatura y tiempo establecidas: corto y largo plazo, 3 ciclos de congelación-descongelación de 12 horas y 3 horas de los extractos dentro del automuestreador. Este parámetro determinó que las condiciones de temperatura y tiempo fueron las óptimas para la amiodarona y la

desetilamiodarona en plasma. Sin embargo en tejido la MCB de desetilamiodarona en el periodo de largo plazo y en el autoanalizador no fue recuperada en más de un 85% en tejido adiposo subcutáneo como lo especifica la NOM-177-SSA1-2013, por lo que queda especificado que desetilamiodarona no demuestra estabilidad tras ser procesada y resguardada por 3 horas dentro del automuestreador y de ser necesaria la cuantificación en tejido adiposo tendrían que reajustarse los tiempos de trabajo para evitar tal condición.

Diversos autores han determinado fármacos en diferentes matrices, sin embargo, las publicaciones de la validación de los métodos bioanalíticos son muy escasas, debido a la complejidad que involucra manipular un tejido diferente o que las guías solo mencionan al plasma como matriz de trabajo. El grupo de investigación de Heger así como el de Maling reportaron información acerca de las concentraciones de las moléculas en los eritrocitos, sin embargo la parte bioanalítica no es muy detallada, por lo que es difícil comparar los resultados del presente estudio de la validación bioanalítica con los de otros autores.^{41,42}

Existe otro parámetro que la Norma Oficial Mexicana no indica que sea necesario para la validación, aunque otros autores sí lo han evaluado y reportado, el % de recobro, este se define como el porcentaje de extracción del analito previamente adicionado a la matriz evaluada, Rodrigues y colaboradores reportaron valores del 60% aproximadamente para ambas moléculas en los controles ensayados,³⁷ este parámetro analítico no fue ensayado en nuestro estudio, sin embargo podría

haber sido útil en la comparación de las diferentes pendientes obtenidas en la curva de calibración de lisado eritrocitos.

8.3 Procedimientos en unidad clínica

Un total de cinco pacientes fueron incluidos en el presente estudio, sus datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos se encuentran en la tabla 15, de los cuales tres estaban en un régimen de 200 mg de amiodarona cada 24 horas, uno 200 mg cada 12 horas y uno con 100 mg tres veces a la semana, cuatro de cinco pacientes presentaron algún efecto adverso extracardíaco relacionado a la toxicidad por amiodarona.

Tabla 15 Datos clínicos y demográficos de los pacientes

Masculino/femenino, No	3/2
Edad promedio \pm DE (rango) años	51.8 \pm 14.34 (37-75)
Masa corporal, promedio \pm DE, kg	84.60 \pm 15.73 (71-110)
IMC, promedio \pm DE (rango) kg (m ²) ⁻¹	29.45 \pm 2.63 (26.45-33.21)
Pacientes con diagnóstico de falla hepática	Ninguno
Dosis diaria promedio \pm DE (rango) mg	208 \pm 127.09 (42-400)
Tiempo total de tratamiento promedio \pm DE (rango), meses	48.11 \pm 48.22 (12-120)
Dosis total acumulada promedio, \pm DE (rango) g	219.48 \pm 286.32 (73-730)
Terapia concomitante, No	
Digoxina	1
Levotiroxina	1
Diuréticos	3
Beta-bloqueadores	3
Antagonista de los receptores de Calcio	4
Antagonista de los receptores de angiotensina II	2
Estatinas	2
Anticonvulsivo	1
Anticoagulante	3
Hipoglucemiante	2

Los cinco pacientes recibieron amiodarona por un mínimo de tres meses por lo que fue considerado que estaban en el estado estacionario del fármaco según el tiempo de vida media teórico, la concentración media de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos se muestra en la tabla 16.

Tabla 16 Concentración media y rango de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos en pacientes en estado estacionario (n=5)

	Analito	Media ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rango ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
plasma	amiodarona	1.98	(0.93-2.90)
	desetilamiodarona	0.96	(0.54-1.81)
eritrocitos	amiodarona	0.14	(0.06-0.22)
	desetilamiodarona	1.03	(0.37-2.87)

En la figura 21 se muestran las concentraciones medias de amiodarona en plasma y en eritrocitos de los pacientes, la muestras fueron comparadas por el análisis estadístico para ambos analitos por separado entre matrices biológicas.

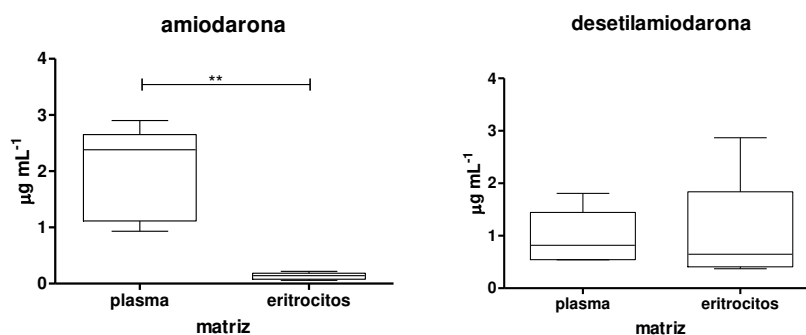


Figura 21 Concentraciones de amiodarona en plasma y eritrocitos y desetilamiodarona plasmática y eritrocitaria de pacientes en estado estacionario (n=5)

La concentración media plasmática de amiodarona fue mayor que la concentración media del fármaco en eritrocitos cuyos valores alcanzaron $1.98 \pm 0.83 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0.14 \pm 0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, esta diferencia resultó ser

significativa ($p=0.0026$) como se muestra en el gráfico 21. Lo contrario fue observado con la desetilamiodarona, los valores no presentaron significancia y fueron $0.96 \pm 0.53 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1.03 \pm 1.04 \mu\text{g mL}^{-1}$. La amiodarona muestra una mayor afinidad por el plasma mientras desetilamiodarona una aparente preferencia por los eritrocitos, sin embargo, analizar un mayor número de pacientes es necesario para establecer esta diferencia y concluir acerca del principal compartimento farmacocinético de las dos moléculas. Heger y colaboradores reportaron que la concentración de amiodarona fue menor en eritrocitos que en plasma de pacientes en terapia crónica y además que los niveles de desetilamiodarona no fueron significativamente diferentes,⁴¹ los resultados del anterior autor coinciden con los de este estudio por lo cual las concentraciones a pesar de ser originados por un número reducido de pacientes muestran resultados verídicos. Maling y colaboradores reportaron que la concentración de desetilamiodarona fue mayor en eritrocitos que en plasma, proponiendo su evaluación en esta matriz en posteriores investigaciones,⁴² en este estudio los mismos resultados fueron obtenidos aunque no fue posible establecer la significancia entre los comportamientos farmacocinéticos para poderlos utilizarlo como marcador de toxicidad.

Tabla 17 Dosis de amiodarona (mg) e IMC (kg m^{-2}) de los pacientes reclutados en el estudio

Paciente	Dosis amiodarona (mg)	Frecuencia	IMC (kg m^{-2})	Estado
1	200	diario	29.07	Sobrepeso
2	200	diario	33.21	Obesidad I
3	200	c/12 h	27.82	Sobrepeso
4	100	lunes, miércoles, viernes	26.45	Sobrepeso
5	200	diario	30.73	Obesidad I

Cuatro de los cinco pacientes, refirieron tomar la dosis de amiodarona antes de los alimentos por la mañana, mientras uno refirió tomarla después de un desayuno alto en grasas aunque no en calorías, el régimen posológico se muestra en la tabla 17. Meng y colaboradores previamente describieron que tras la administración de alimentos, el ABC_T de amiodarona en humanos aumenta entre 2.4 y 3.8 veces, la $C_{\text{máx}}$ aumenta y el $T_{\text{máx}}$ es reducido, comparado con las condiciones de administración en ayuno.⁵² La posible explicación de este comportamiento es que tras la ingesta de alimentos, el vaciado biliar es estimulado, de esta manera la absorción de moléculas ampliamente lipofílicas como amiodarona es facilitado, además del aumento en el flujo sanguíneo que existe durante la absorción y que las grasas presentes en el alimento también favorecen la asimilación, todo esto logra afectar los parámetros farmacocinéticos del antiarrítmico, probablemente reflejándose en una mayor biodisponibilidad. La baja dosis de este paciente además del hábito de tomar el medicamento con alimentos y el uso concomitante de digoxina que controla su actividad cardíaca

quizá es una de las posibles explicaciones del control de su patología, además de que el paciente está en tratamiento con amiodarona por 6 años y con levotiroxina como tratamiento de hipotiroidismo lo que demuestra un efecto adverso extracardíaco del medicamento, al haber iniciado la terapia de reemplazo hormonal tiempo después de haber iniciado con amiodarona. En la tabla 17 se muestran las dosis de cada uno de los pacientes en el estudio, la frecuencia de administración y el IMC.

En el presente estudio no fue posible determinar el Vd del fármaco, debido a la dificultad de tomar la muestra tiempo después de la administración del medicamento, sin embargo el IMC (Índice de Masa Corporal) si fue posible calcularlo de los datos de peso y estatura, según la clasificación emitida por la OMS,⁵³ la tabla 17 indica que tres de los pacientes padecen de sobrepeso mientras 2 de obesidad I, por lo que se podría esperar que el Vd de este fármaco en dichos pacientes sea amplio, teniendo como consecuencia que al iniciar tratamiento con amiodarona o cualquier otra molécula de carácter no polar, el efecto terapéutico se vería retrasado, debido a que toma tiempo el llenado o impregnado de los principales órganos de carácter lipofílico. Fukuchi y colaboradores reportaron que los efectos adversos tienen una mayor prevalencia en aquellos pacientes con un menor IMC comparado con los de un mayor IMC,²⁰ debido a la diferencia de fracciones de amiodarona circulante en sangre y acumulada en órganos de carácter no polar, lo que evidentemente marca una diferencia entre la concentración metabolizada principalmente por el hígado y

convertida a desetilamiodarona, siendo esta molécula presuntivamente la de mayor toxicidad.

Lafuente y colaboradores concluyeron que la duración de la terapia marca la diferencia entre presentar algún efecto adverso y no manifestarlo,²⁵ en el presente estudio cuatro de los pacientes presentaron efectos adversos, el paciente que no presentó ninguna reacción adversa mostró un IMC de 33.21 kg m⁻² siendo el mayor de todos los IMC calculados y el de menor dosis acumulada de amiodarona. Cheymol y colaboradores, han descrito los efectos de la obesidad en la farmacocinética e indican que el objetivo en este padecimiento es el ajuste de dosis, en particular de los fármacos de índice estrecho terapéutico, ya que el desempeño cardíaco, porcentaje de unión a proteínas de los fármacos y enzimas metabolizadoras CYP, entre otros factores son afectados, todo esto alterando la distribución, metabolismo y eliminación, aunque no la absorción y como resultado conduce en la necesidad de modificar la dosis de carga y mantenimiento.⁵⁴ En México ha sido reportado que el 72.5% de adultos mayores de 20 años padecían de obesidad en el 2016,⁵⁵ por lo que la necesidad de ajustar dosificaciones de diversos medicamentos es una solución ante la problemática, aunque no es habitual. Fukuchi y colaboradores sugieren que emplear estimados de variabilidad interpacientes y una guía de dosificación es necesario, al reportar que el aclaramiento y la actividad del *CYP3A4* se ve influenciado conforme aumenta el IMC.²⁰ Por lo tanto, la concentración de amiodarona en sangre se

podría explicar al describir el IMC, edad y dosis en las diferentes poblaciones farmacocinéticas.

Maling y colaboradores sugieren que la concentración de amiodarona intracelular en eritrocitos no proporciona la suficiente información para determinar un límite de toxicidad, el tema aún sigue sin describirse en su totalidad por lo que la única explicación es la alta variabilidad inter-pacientes en terapia crónica oral, además de que las concentraciones del fármaco en plasma tampoco han sido definidas adecuadamente.⁵⁶

La extensa acumulación de amiodarona y desetilamiodarona conducen a cambios estructurales celulares ocasionando alteraciones en el metabolismo celular de lípidos, estos cambios son característicos en las reacciones adversas ocasionadas por amiodarona en piel, hígado, pulmones y Sistema Nervioso.⁵⁷ En el presente estudio, cuatro de los cinco pacientes reclutados en el estudio refirieron algún signo o síntoma de reacción adversa a amiodarona, por lo que no fue posible formar dos grupos en presencia y ausencia de dichos efectos como fue establecido. En la tabla 18 se muestran los efectos adversos extracardíacos evaluados en los pacientes, la descripción de cómo fueron detectados y el número de incidencia en el grupo de 5 pacientes.

Tabla 18 Frecuencia de reacciones adversas extracardíacas

Efecto adverso extracardíaco	Descripción	No
Tiroides	Desbalance en perfil tiroideo	2
Hígado	Pruebas de función hepática	0
Ojos	Depósitos córneales	3
Piel	Manchas características	0

El efecto adverso de mayor prevalencia en el grupo de pacientes fue la manifestación de los microdepósitos corneales, Vassallo y colaboradores habían reportado que más del 90% de los pacientes en tratamiento con amiodarona presentan microdepósitos oculares,²⁴ en el presente estudio tres de cinco pacientes refirieron resequedad y sensación de rugosidad en el ojo acompañada de prurito, por lo que consideró como efecto adverso relacionado a la toxicidad del antiarrítmico, Alnawaiseh y colaboradores reportaron previamente que la queratinopatía por amiodarona exhibía una fuerte correlación de desetilamiodarona sérica, por lo que sugieren que el metabolito se deposita sobre los epitelios de la córnea al ser excretado por las glándulas lacrimales.⁵⁸ Adicionalmente, este padecimiento es el de mayor prevalencia para los reportados para el antiarrítmico, no causa problemas visuales por lo que ha sido considerado uno de los efectos adversos a amiodarona clínicamente no significativo.⁵⁹

El otro efecto adverso encontrado en el grupo de pacientes fueron los desequilibrios en los niveles de las hormonas T4, T3 y TSH, dos de los cinco pacientes reclutados, manifestaron necesitar de tratamiento con levotiroxina después de haber iniciado terapia con amiodarona, por lo que esto fue considerado hipotiroidismo como reacción adversa extracardíaca, la prevalencia del hipotiroidismo es del 6%,²⁴ aunque el valor tiende a variar de acuerdo a la zona geográfica, la posible explicación ante el efecto adverso extracardíaco por amiodarona es que una dosis de 200 mg contiene 75 mg de Yodo orgánico, del cual entre 8-17 % es liberado a circulación, siendo 100 veces los requerimientos diarios del halógeno, además se ha demostrado que la amiodarona inhibe la actividad de la enzima 5'-deiodinasa disminuyendo la cantidad de T3 y aumentando la cantidad de T4 y rT3 hasta un 25 %.⁶⁰ Rankin y colaboradores en un estudio retrospectivo de 1413 pacientes en tratamiento con amiodarona concluyeron que al inicio de la terapia con el antiarrítmico, un perfil hepático y tiroideo debe ser realizado en los pacientes para establecer los valores basales de TSH como marcador de toxicidad tiroideo y ALT como marcador de toxicidad hepática, es así que cuando el valor de la TSH sea por debajo del límite inferior normal sea considerado como hipertiroidismo, por otro lado hipotiroidismo para niveles superiores al límite superior normal y cuando el valor de ALT sea 3 veces el límite superior normal se consideraría como reacción adversa a amiodarona, indicando una necesidad de disminución de la dosis.⁴³ Esta propuesta es una alternativa a la prevención de reacciones adversas de mayor gravedad al paciente, la fibrosis pulmonar, aun cuando es el efecto adverso de menor frecuencia puede predisponer en riesgo la vida el paciente siendo el efecto

adverso de mayor gravedad, el objetivo del tratamiento con amiodarona es controlar la taquicardia con el menor riesgo posible.

Otros efectos adversos como la coloración grisácea en piel o fibrosis pulmonar no fueron encontrados debido al reducido número de pacientes reclutados, una de las perspectivas del estudio es aumentar el número de pacientes en tratamiento con el antiarrítmico, realizar análisis estadísticos y determinar si la concentración de desetilamiodarona en eritrocitos pudiera servir como marcador de toxicidad temprana por amiodarona. Afortunadamente la mayoría de los efectos adversos por el antiarrítmico son reversibles al disminuir la dosis o suspender el fármaco, la monitorización terapéutica de fármacos podría ser una de las alternativas que provee de información útil para tomar la decisión del grado de ajuste de fármacos en estas situaciones.

Hrudikova y colaboradores reportaron que la biodisponibilidad de amiodarona aumenta gradualmente con el tiempo de terapia, que el metabolito principal se acumula en mayor cantidad en tejidos y las concentraciones de amiodarona y desetilamiodarona varían considerablemente inter-sujetos e intra-sujetos, por lo que sugieren que el dato de la concentración de desetilamiodarona no puede ser ocupado en el ajuste de dosis.²⁶ La eficacia de la amiodarona en el control de las arritmias ha sido reportada en $0.1-11.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ mientras que la concentraciones sugeridas son de $0.5-1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ también se ha indicado que una

mayor concentración de $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ofrece un efecto antiarrítmico adicional.⁶¹ Considerando los resultados de las fluctuantes concentraciones de los pacientes estudiados, una manera de interpretar las concentraciones de amiodarona y desetilamiodarona en plasma es determinando la concentración terapéutica individual y un registro de dosis acumulada como lo sugieren los anteriores autores.

Ryosuke y colaboradores describieron cómo el aclaramiento de amiodarona es influenciado por el IMC, dosis diaria, género y duración de terapia proponiendo cálculos específicos para la población que está en tratamiento con este antiarrítmico con el objetivo de calcular una óptima dosis de mantenimiento.⁶² Considerando que para la población de estudio se dificulta conocer la concentración mínima tóxica, una alternativa es el desarrollo de un modelo matemático farmacocinético para el cálculo de dosis de mantenimiento ya que es relativamente sencillo estimar el aclaramiento por el empleo de datos rutinarios como creatinina, peso corporal, dosis acumulada y un dato de amiodarona plasmática.

En los pacientes consultados un análisis de interacciones de la farmacoterapia concomitante, fue realizado en el *Drug Interaction-Checker* del sitio de internet MEDSCAPE,⁶³ sumando un total de 54 interacciones medicamentosas encontradas, de las cuales el 12.9% fueron menores, 75.9% de observación y el

11.1% como serias, recomendándose en estas últimas el intercambio de alguno de los medicamentos implicados. Las interacciones entre amiodarona-sotalol y amiodarona-digoxina fueron clasificadas como serias, aunque otras en las que no está implicado el antiarrítmico también son clasificadas en esta categoría como: diltiazem-metoprolol, en esta situación cada fármaco incrementa la toxicidad del otro por algún mecanismo no conocido, teniendo como consecuencia una probable bradicardia, un electrocardiograma sería la manera de investigar si el efecto adverso relacionado indirectamente a amiodarona estuviera presente.

Es de relevancia clínica que las interacciones y consecuencias de otros medicamentos en la terapia concomitante del paciente pueden interferir en las concentraciones de amiodarona, así como en la manifestación de reacciones adversas que pudieran ser confundidas con las del antiarrítmico. En estudios previos ya se había reportado que la amiodarona presenta interacciones con otros medicamentos, Vassallo y colaboradores reportaron que las interacciones de mayor atención son las relacionadas con warfarina y digoxina, afectando la farmacocinética de estas últimas.²⁴ Considerando la amplia variedad de efectos adversos del fármaco y la gran efectividad en el control de las arritmias, es fundamental describir el mecanismo de acción, el perfil de reacciones relacionadas a la toxicidad de amiodarona y factores de riesgo de los pacientes para hacer un correcto uso del antiarrítmico.

9. CONCLUSIONES

Fue desarrollado un método simultáneo de extracción líquido-líquido de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, lisado eritrocitario y otro para tejido adiposo subcutáneo, por el empleo de 600 μL de plasma y lisado eritrocitario y 0.5 g de tejido adiposo subcutáneo con posible aplicación en muestras de pacientes.

Fueron validados y desarrollados dos métodos cromatográficos empleando un cromatógrafo HPLC con detector UV-Vis, con un rango de trabajo de 0.125 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y un Límite Inferior de Cuantificación de 0.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en plasma y lisado eritrocitario mientras un rango de trabajo de 1.0 a 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ y un Límite Inferior de Cuantificación de 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ en tejido adiposo subcutáneo, empleando una columna de fase reversa C18, y una fase móvil de acetonitrilo, metanol, buffer de acetatos (60:30:10) V/V/V, para la cuantificación de amiodarona y desetilamiodarona en el plasma y los eritrocitos.

Los métodos fueron validados de acuerdo con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece los procedimientos para cuantificar fármacos en plasma.

La concentración de amiodarona en plasma fue mayor que en eritrocitos y lo mismo no sucedió con desetilamiodarona ya que no mostró diferencias de concentración en plasma y eritrocitos, en pacientes con terapia crónica oral en presencia de efectos adversos relacionados a la toxicidad por amiodarona.

La amiodarona se acumula en mayor grado en plasma que en eritrocitos, por lo que este reservorio farmacocinético indica ser un buen sitio de monitorización de las concentraciones de amiodarona, por otro lado desetilamiodarona aparenta acumularse en mayor grado en eritrocitos, por lo que cuantificar ambas moléculas en plasma y eritrocitos podría relacionarse con la presencia o ausencia de reacciones adversas relacionadas a la toxicidad de amiodarona.

Este reporte constituye una opción para la determinación simultánea de amiodarona y desetilamiodarona en muestras del plasma, eritrocitos y tejido adiposo subcutáneo con el fin de identificar concentraciones determinantes para la aparición de reacciones adversas relacionadas a toxicidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Promoción del uso racional de medicamentos: componentes centrales - Perspectivas políticas de la OMS sobre medicamentos. *Perspect políticas sobre Medicam la OMS*. 2002;5:6. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4874s/>.
2. Bonal J, Alerany C, Bassons T, Gascón P. Farmacia Clínica y Atención Farmacéutica. *Farm Hosp - Tomo I*. 2002;1(2):275-293. doi:10.1016/j.farma.2010.07.004
3. Herendael H Van, Dorian P. Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6(1):465-472. doi:10.2147/VHRM.S6611
4. Aldaz A, Ferriols R, Aumente D, et al. Monitorización farmacocinética de antiepilépticos. *Farm Hosp*. 2011;35(6):326-339. doi:10.1016/j.farma.2010.10.005
5. National Center for Health Statistics. Health, United States, 2015: With Special Feature on Racial and Ethnic Health Disparities. *Heal United States, 2015 With Spec Featur Racial Ethn Heal Disparities*. 2016:107. doi:76-641496
6. WHO. WHO Methods and data sources for country-level causes of death 2000-2015. *Glob Heal Estim Tech Pap*. 2017:1-81. doi:10.1016/j.mpmmed.2016.06.006
7. Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *Eur Heart J*. 2015;36(41):2793-2867. doi:10.1093/eurheartj/ehv316
8. Población. Número de habitantes. <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/defunciones.aspx?tema=P>. Accessed January 17, 2018.
9. Almendral Garrote, Jesús. Marín Huerta Emilio, Medina Moreno Olga, Peinado Peinado Rafael, Pérez Álvarez, Luisa. Ruiz Granell, Ricardo. Viñolas Prat X. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. *Soc Española Cardiol*. 2014:1095-1120.
10. Granada J, Uribe W, Chyou PH, et al. Incidence and predictors of atrial flutter in the general population. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36(7):2242-2246. doi:10.1016/S0735-1097(00)00982-7
11. Montes-Santiago J, Rodil V, Formiga F, Cepeda JM, Urrutia a. Features and costs of patients admitted for cardiac arrhythmias in Spain. *Rev clínica española*. 2013;213(5):235-239. doi:10.1016/j.rce.2013.02.003
12. Lafuente-Lafuente C, Longas-Tejero M, Bergmann J, Belmin J. Antiarrhythmics for maintaining sinus rhythm after cardioversion of atrial fibrillation. A survey of a Cochrane review. *Cochrane Libr*. 2012;170(3):3870-3873. doi:.
13. IMSS. Guía de Práctica Clínica GPC Tratamiento Farmacológico de la Artritis Idiopática Juvenil Guía de Referencia Rápida Tratamiento Farmacológico de la Artritis Idiopática Juvenil. 2012.
14. Hrudikova Vyskocilova E, Grundmann M, Duricova J, Kacirova I. Therapeutic monitoring of amiodarone: Pharmacokinetics and evaluation of the relationship between effect and

- dose/concentration. *Biomed Pap*. 2017;161(2):134-143. doi:10.5507/bp.2017.016
15. Kowey PR, Marinchak RA, Rials SJ, Bharucha D. Pharmacologic and Pharmacokinetic Profile of Class III Antiarrhythmic Drugs. *Am J Cardiol*. 1997;80(8):16G-23G. doi:10.1016/S0002-9149(97)00710-8
 16. Quaglini D, Ha HR, Duner E, et al. Effects of metabolites and analogs of amiodarone on alveolar macrophages: structure-activity relationship. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(2):L438-47. doi:10.1152/ajplung.00434.2003
 17. Pollak PT. Oral amiodarone: historical overview and development. *Pharmacotherapy*. 1986;18(6 Pt 2):121S-126S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9855344>.
 18. Singh BN. Antiarrhythmic Actions of Amiodarone: A Profile of a Paradoxical Agent. *Am J Cardiol*. 1996;78:41-53.
 19. Roth FC, Mulder JE, Brien JF, Takahashi T, Massey TE. Cytotoxic interaction between amiodarone and desethylamiodarone in human peripheral lung epithelial cells. *Chem Biol Interact*. 2013;204(3):135-139. doi:10.1016/j.cbi.2013.05.006
 20. Fukuchi H, Nakashima M, Araki R, et al. Effect of obesity on serum amiodarone concentration in Japanese patients: Population pharmacokinetic investigation by multiple trough screen analysis. *J Clin Pharm Ther*. 2009;34(3):329-336. doi:10.1111/j.1365-2710.2008.00987.x
 21. Wu Q, Ning B, Xuan J, Ren Z, Guo L, Bryant MS. The role of CYP 3A4 and 1A1 in amiodarone-induced hepatocellular toxicity. *Toxicol Lett*. 2016;253:55-62. doi:10.1016/j.toxlet.2016.04.016
 22. Zahno A, Brecht K, Morand R, et al. The role of CYP3A4 in amiodarone-associated toxicity on HepG2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(3):432-441. doi:10.1016/j.bcp.2010.11.002
 23. Chemicalize. Chemicalize. <https://chemicalize.com/#/>. Published 2017. Accessed January 18, 2018.
 24. Vassallo P, Trohman RG. Prescribing Amiodarone. *Jama*. 2007;298(11):1312. doi:10.1001/jama.298.11.1312
 25. Lafuente-Lafuente C, Alvarez JC, Leenhardt A, et al. Amiodarone concentrations in plasma and fat tissue during chronic treatment and related toxicity. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;67(5):511-519. doi:10.1111/j.1365-2125.2009.03381.x
 26. Hrudikova Vyskocilova E, Grundmann M, Duricova J, Kacirova I. Therapeutic monitoring of amiodarone: Pharmacokinetics and evaluation of the relationship between effect and dose/concentration. *Biomed Pap*. 2017;161(2):134-143. doi:10.5507/bp.2017.016
 27. Calvo, M.V., Garcia, M.J., Martínez, J., Fernandez MM. Farmacocinética clínica. *Farm Hosp - Tomo I*. 2002:626-627, 633. <http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap212.pdf>.
 28. Waldhauser KM, Torok M, Ha HR, et al. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;319(3):1413-1423. doi:10.1124/jpet.106.108993
 29. Endo S, Toyoda Y, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Stimulation of Human Monocytic THP-1 Cells by Metabolic Activation of Hepatotoxic Drugs. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2012;27(6):621-630. doi:10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-019

30. Xuan J, Chen S, Ning B, Tolleson WH, Guo L. Development of HepG2-derived cells expressing cytochrome P450s for assessing metabolism-associated drug-induced liver toxicity. *Chem Biol Interact.* 2016;255:63-73. doi:10.1016/j.cbi.2015.10.009
31. Nikaido A, Tada T, Nakamura K, et al. Clinical features of and effects of angiotensin system antagonists on amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Int J Cardiol.* 2010;140(3):328-335. doi:10.1016/j.ijcard.2008.11.106
32. Mulder JE, Brien JF, Racz WJ, Takahashi T, Massey TE. Mechanisms of Amiodarone and Desethylamiodarone Cytotoxicity in Nontransformed Human Peripheral Lung Epithelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(2):551-559. doi:10.1124/jpet.110.173120
33. Santos FB, Garcia CSNB, Xisto DG, et al. Effects of amiodarone on lung tissue mechanics and parenchyma remodeling. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;162(2):126-131. doi:10.1016/j.resp.2008.05.004
34. Maes A, Baert K, Croubels S, et al. Determination of amiodarone and desethylamiodarone in horse plasma and urine by high-performance liquid chromatography combined with UV detection and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2006;836(1-2):47-56. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.038
35. Kuhn J, Götting C, Kleesiek K. Simultaneous measurement of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma and serum by stable isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;51(1):210-216. doi:10.1016/j.jpba.2009.08.004
36. Rodrigues M, Alves G, Ferreira A, Queiroz J, Falcão A. A rapid HPLC method for the simultaneous determination of amiodarone and its major metabolite in rat plasma and tissues: A useful tool for pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Sci.* 2013;51(4):361-370. doi:10.1093/chromsci/bms149
37. Rodrigues M, Alves G, Rocha M, Queiroz J, Falcão A. First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2013;913-914:90-97. doi:10.1016/j.jchromb.2012.11.028
38. EMA. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA, Comm Med Prod Hum Use.* 2012;44(July 2011):1-23. doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009
39. DOF DO de la F. NOM-177-SSA1-2013. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013. Published 2018. Accessed January 21, 2018.
40. Barbieri E, Conti F, Zampieri P, et al. Amiodarone and desethylamiodarone distribution in the atrium and adipose tissue of patients undergoing short- and long-term treatment with amiodarone. *J Am Coll Cardiol.* 1986;8(1):210-213. doi:10.1016/S0735-1097(86)80114-0
41. Heger JJ, Solow EB, Prystowsky EN, Zipes DP. Plasma and red blood cell concentrations of amiodarone during chronic therapy. *Am J Cardiol.* 1984;53(7):912-917. doi:10.1016/0002-9149(84)90524-1
42. Maling TJ, Siebers RW, Burgess CD, Taylor C, Purdie G. Individual variability of amiodarone distribution in plasma and erythrocytes: implications for therapeutic monitoring. *Ther Drug Monit.* 1989;11(2):121-126.

43. Rankin S, Elder DH, Ogston S, George J, Lang CC, Choy AM. Population-Level Incidence and Monitoring of Adverse Drug Reactions with Long-term Amiodarone Therapy. *Cardiovasc Ther.* 2017;(March):n/a-n/a. doi:10.1111/1755-5922.12258
44. Raeder EA, Podrid PJ, Lown B. Side effects and complications of amiodarone therapy. *Am Heart J.* 1985;109(5 PART 1):975-983. doi:10.1016/0002-8703(85)90238-8
45. Storey GCA, Adams PC, Campbell RWF, Holt DW. High-performance liquid chromatographic measurement of amiodarone and desethylamiodarone in small tissue samples after enzymatic digestion. 1983;(February):785-789.
46. Valencia M, Zapata V, Bider A. Cuantificación de amiodarona en suero mediante precipitación de proteínas seguida de cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta. 2000:53-60.
47. El-Bagary RI, Elkady EF, Mowaka S, Attallah MA. Validated HPLC and ultra-HPLC methods for determination of dronedarone and amiodarone-application for counterfeit drug analysis. *J AOAC Int.* 2015;98(6):1496-1502. doi:10.5740/jaoacint.15-054
48. Kollroser M. Determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with an ion trap detector. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2002;766(2):219-226. doi:10.1016/S0378-4347(01)00469-8
49. Kogure Y, Sezaki H. Evaluation of the Rapid Detection Method of Amiodarone By Lc / Ms / Ms. :2-5.
50. Shayeganpour Anooshirvan, Somayaji Vishwa BDR. A liquid chromatography-mass spectrometry assay method for simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in rat specimens. *Biomed Chromatogr.* 2007;1(2):284-290. doi:10.1002/bmc.754
51. Montes R, Rodríguez I, Casado J, López-Sabater MC, Cela R. Determination of the cardiac drug amiodarone and its N-desethyl metabolite in sludge samples. *J Chromatogr A.* 2015;1394:62-70. doi:10.1016/j.chroma.2015.03.024
52. Meng X, Mojaverian P, Doedée M, et al. Bioavailability of amiodarone tablets administered with and without food in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 2001;87(4):432-435. doi:10.1016/S0002-9149(00)01396-5
53. WHO. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed July 17, 2018.
54. Cheymol G. Effects of obesity on pharmacokinetics implications for drug therapy. *Clin Pharmacokinet.* 2000;39(3):215-231. doi:10.2165/00003088-200039030-00004
55. ENSANUT. Cifras de Sobrepeso y Obesidad en México-ENSANUT MC 2016 | OMENT. <http://oment.uanl.mx/cifras-de-sobrepeso-y-obesidad-en-mexico-ensanut-mc-2016/>. Accessed September 4, 2018.
56. Maling T. Amiodarone Therapeutic Plasma Concentration Monitoring: Is it Practical? *Clin Pharmacokinet.* 1988;14(6):321-324. doi:10.2165/00003088-198814060-00001
57. Adams PC, Holt DW, Storey GC, Morley AR, Callaghan J, Campbell RW. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation.* 1985;72(5):1064-1075. doi:10.1161/01.CIR.72.5.1064
58. Alnawaiseh M, Zumhagen L, Zumhagen S, et al. Corneal Densitometry as a Novel

Technique for Monitoring Amiodarone Therapy. *Ophthalmology*. 2016;123(11):2294-2299. doi:10.1016/j.ophtha.2016.08.001

59. Ciancaglini M, Carpineto P, Zuppari E, Nubile M, Doronzo E, Mastropasqua L. In vivo confocal microscopy of patients with amiodarone-induced keratopathy. *Cornea*. 2001;20(4):368-373. doi:10.1097/00003226-200105000-00007
60. Thyroid Dysfunction Induced by Amiodarone Therapy: Background, Pathophysiology, Epidemiology. <https://emedicine.medscape.com/article/129033-overview#showall>. Accessed January 14, 2018.
61. Latini R, Tognoni G, Kates RE. Clinical Pharmacokinetics of Amiodarone. 1984;156:136-156.
62. Araki R, Yukawa E, Nakashima MN, et al. Population Pharmacokinetic Investigation for Optimization of Amiodarone Therapy in Japanese Patients. *Ther Drug Monit*. 2011;33(6):750-756. doi:10.1097/FTD.0b013e318239a728
63. MEDSCAPE. Drug Interactions Checker - Medscape Drug Reference Database. <https://reference.medscape.com/drug-interactionchecker>. Accessed August 13, 2018.

ANEXO A. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	
<i>Nombre del estudio:</i>	<i>Asociación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en tejido adiposo y eritrocitos con la aparición de reacciones adversas en terapia crónica oral.</i>
Lugar y fecha:	UMAE Hospital de Cardiología No. 34, Departamento de Cardiología.
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Estudiar la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma y eritrocitos en relación a los efectos adversos.
Procedimientos:	Se realizará una entrevista con el participante de aproximadamente 15 minutos y se tomará una muestra de sangre.
Posibles riesgos y molestias:	Menores.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Conocer la cantidad de fármaco presente en el cuerpo y se podrá identificar si el participante presenta algún efecto secundario de amiodarona.
Participación o retiro:	Puede retirarse del proyecto en cualquier momento en que lo desee sin ninguna consecuencia. En caso de que las preguntas durante la entrevista le parezcan incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.
Privacidad y confidencialidad:	Toda la información recolectada será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.
Beneficios al término del estudio:	Conocer la cantidad de fármaco presente en el cuerpo, con lo cual se podrá mejorar el tratamiento y/o disminuir aparición de efectos secundarios
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dr. Arturo Muñiz García
Colaboradores:	Dra. Élica Marcela Aguilar Bravo, QFB Alejandro Quintero González
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx	
<div style="text-align: center; margin-top: 20px;">Nombre y firma del sujeto</div> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">Testigo 1</div> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">Nombre, dirección, relación y firma</div>	<div style="text-align: center; margin-top: 20px;">Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento</div> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">Testigo 2</div> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;">Nombre, dirección, relación y firma</div>
<p>Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio</p> <p style="text-align: right;">Clave: 2810-009-013</p>	

ANEXO B. DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y FARMACOTERAPÉUTICO

Determinación de la concentración de amiodarona y desetilamiodarona en plasma, eritrocitos y tejido adiposo subcutáneo en terapia crónica oral

Edad (años)	Fecha de nacimiento (dd/mm/aaaa)	Peso (kg)	Talla (m)	IMC (kg m ⁻²)

Dosis:

Medicamento	Dosis (mg)	Frecuencia	(antes/después) de alimentos	Horario

Reacciones adversas al medicamento extracardíacas:

RAM	Si	No	Descripción

Otros fármacos:

Medicamento	Dosis (mg)	Frecuencia	(antes/después) de alimentos	Horario

ANEXO C. REPORTE DE CONCENTRACION PLASMÁTICA Y ERITROCITARIA E INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS

Datos		
Nombre	Fecha de Nacimiento	
Edad	Peso (kg)	
Talla (m)	IMC (kg m ⁻²)	
Terapia		
Medicamento	Dosis (mg)	Frecuencia

Interacciones medicamentosas		
Interacción	Descripción	Recomendación
Referencia: https://reference.medscape.com/drug-interactionchecker		

Concentraciones de amiodarona y desetilamiodarona

	Plasma	Eritrocitos
amiodarona µg mL ⁻¹		
desetilamiodarona µg mL ⁻¹		

NOTA: *la información debe ser interpretada por el médico especialista tratante, las concentraciones deben ser confirmadas con algún laboratorio certificado.*